

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2016.07.03

旋覆代赭汤对 RE 模型大鼠食管组织线粒体超微结构及 SDH 活性的影响

李 姿¹, 韩 慧², 杨幼新¹, 许云姣¹, 李 美¹, 袁红霞¹

(¹天津中医药大学,天津 300193;

²天津中医药大学附属北辰中医院 中医内科,天津 300400)

摘要:[目的]通过分析旋覆代赭汤及其拆方对反流性食管炎(RE)模型大鼠食管组织线粒体超微结构及琥珀酸脱氢酶(SDH)活性的影响,从微观角度探讨线粒体能量代谢与脾胃气机升降的相关性,阐释 RE 关键病机及旋覆代赭汤治疗 RE 的作用机理。[方法]将 84 只雄性 Wistar 大鼠随机分为 7 组,即正常对照组、模型对照组、旋覆代赭汤全方组及拆方各组(包括苦降组、甘升组、升降相因组)、西药组,每组 12 只。采用“4.2 mm 幽门夹+胃底 2/3 结扎术”制备酸碱混合反流性食管炎动物模型。从术后第 8 天开始,正常对照组、模型对照组给予生理盐水灌胃,旋覆代赭汤全方组及拆方各组分别给予相应药液,西药组给予(兰索拉唑+莫沙必利)灌胃,干预 14 d 后,第 22 天全部处死,利用肉眼及光学显微镜观察食管下段黏膜组织形态学变化,应用电镜观察食管下段黏膜组织线粒体超微结构变化,应用化学法测定食管组织 SDH 活性的表达情况。[结论]旋覆代赭汤各组分药物都可通过一定途径调节食管组织线粒体能量代谢,甘升组可促进线粒体能量代谢,凡是含有甘升组皆起正性作用,因甘升组药物可促进细胞的新陈代谢,得“扶正益气,健脾化源”之功。旋覆代赭汤通过调节脾胃气机升降,提高食管组织线粒体中 SDH 的活性,促进线粒体能量代谢,增加线粒体数量,减少线粒体结构及食管黏膜损伤,证实了气机升降与线粒体能量代谢的相关性,从线粒体能量代谢角度揭示了旋覆代赭汤治疗 RE 的作用机制及途径,并进一步证实 RE 的关键病机是“胃虚气逆”。

关键词:反流性食管炎;旋覆代赭汤;琥珀酸脱氢酶;线粒体能量代谢

中图分类号:R571 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-038X(2016)07-0499-05

Effects of Xuanfu Daizhe Decoction on SDH activity and ultrastructure of esophageal mitochondria in reflux esophagitis rats

LI Zi¹, HAN Hui², YANG You-xin¹, XU Yun-jiao¹, LI Mei¹, YUAN Hong-xia¹

(¹Tianjin Traditional Chinese Medical University, Tianjin 300193, China; ²Beichen Traditional Chinese Medical Hospital Affiliated to Tianjin Traditional Chinese Medical University, Tianjin 300400, China)

Corresponding author: YANG You-xin, E-mail: youxin_yang@hotmail.com

Abstract: [Objective] To elucidate the key pathogenesis of reflux esophagitis (RE) and the mechanism of Xuanfu Daizhe Decoction (XDD) on it by analyzing the effects of XDD and its separated prescription on esophageal mitochondria ultrastructure and SDH activity in model rats. [Methods] Eighty-four male Wistar rats were randomly divided into 7 groups ($n=12$ in each), named the normal control group, the model control group, the whole XDD group, and separated prescription of XDD group including the Ku Jiang group, the Gan Sheng group, the Sheng Jiang Xiang Yin group, and the western medicine group treated by Lansoprazole and Mosapride. The mixed acid and alkali RE models were prepared by the 4.2 mm pylorus clamp and two-thirds of gastric fundus ligation. Eight days after operation, the normal control group and model control group were administrated saline, the XDD group and the each separated prescription group were given corresponding medicine. The medicine group were administrated with lansoprazole and mosapride in-

收稿日期:2015-10-20

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No:81173243)

作者简介:李 姿,女,硕士,研究方向:中医内科脾胃病

通讯作者:杨幼新, E-mail: youxin_yang@hotmail.com

tragastrically, fourteen days after intervention, all of the rats were executed at 22 th day, then the morphological changes of the lower part of esophageal mucosa tissue were observed by naked eyes and optical microscope, meanwhile, the esophageal mitochondria ultrastructural changes of the lower part of esophageal mucosa tissue were observed by electron microscopy. The expression of SDH-activity in esophageal tissue were detected by chemistry method. [Results] The components of the XDD regulated the mitochondrial energy metabolism of esophageal tissue through a certain way. In Gan Sheng group, the generation of ATP was promoted in mitochondrial energy metabolism, and all drugs which contained Gan Sheng group played a positive role. Decoction regulated the qi of spleen and stomach ascending-descending to increase the activity of SDH in the esophageal tissue mitochondria, and promoted the generation metabolism of mitochondrial energy ATP, increased the number of mitochondria, and reduced the damage of mitochondrial structure and esophageal mucosa. [Conclusion] It confirmed the correlation of Qi ascending-descending and mitochondrial energy metabolism, and revealed the mechanism and pathway that the XDD in treating RE mitochondrial energy metabolism, and further affirmed that the key pathogenesis of RE is Qi ascending and stomach deficiency.

Key words: Reflux esophagitis; Xuanfu Daizhe Decoction; succinate dehydrogenase; mitochondrial energy metabolism

反流性食管炎(RE)属于胃食管反流病(GERD)的范畴,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慢性难治性疾病^[1]。其发病率在全球范围内呈逐渐上升趋势,且该病的发展使得 Barrett 食管和食管腺癌的发病风险相应增高^[2-4]。目前西医治疗以口服 PPI 类药物作为首选,并结合促胃动力药物、内镜下治疗、手术等。但长期服用抑酸药物会改变胃内环境,出现各种并发症,停药后症状容易反复,且难治性患者对药物反应不佳,严重影响患者生活质量^[5-8]。本课题组从多年的中医临床实践中总结经验,并开展大量动物实验研究及临床调查,认为该病的关键病机为“脾胃虚弱、胃气上逆、升降失调”,以《伤寒论》经方“旋覆代赭汤”加减辨治 RE。琥珀酸脱氢酶(SDH)为线粒体的一种标志酶^[9],是线粒体内膜连接氧化磷酸化与电子传递的枢纽之一,可从一定角度表达线粒体能量代谢,从而反映食管平滑肌舒缩功能。本次实验通过测定 RE 模型大鼠食管线粒体 SDH 活性,从线粒体能量代谢角度探讨旋覆代赭汤治疗 RE 的相关作用机制,可进一步证实该方临床疗效。

1 材料与方法

1.1 材料

动物健康清洁级 12 周龄(200±20 g)雄性 Wistar 大鼠 84 只,合格证号:MA-2014-111,饲养于 II 级动物饲养室。

药品中药药材使用颗粒剂,西药使用枸橼酸莫沙比利片与兰索拉唑肠溶片。

试剂病理、包埋、染色等所需基本试剂(天津市中西医结合急腹症研究所提供),注射用生理盐水、

0.5%碘伏、注射用左氧氟沙星,10%水合氯醛、10%甲醛溶液,苏木精、伊红染色液,考马斯亮兰蛋白测定试剂盒,琥珀酸脱氢酶(SDH)测定试剂盒。

器械与仪器动脉夹、眼科尖头组织镊、眼科手术剪、6/0 带针缝合线、3/0 缝线、持针器、注射器等常规手术器械;宽度为 3.0 mm 的双扁铁心包扎线(夹心金属直径 0.3 mm)、直径为 4.2 mm 圆柱形钢条;NOVEL 光学显微镜,型号:XS2-106 B(N);防脱氨基载玻片;莱卡(LEICA)超薄切片机,型号:EMUC6;日立透射电子显微镜,型号:H7650(中国科学院天津工业生物技术研究所提供);恒温水浴箱,型号:DZW-4 型;精密电子天平,型号:AE16 O 型电子分析天平;Heraeus 台式高速离心机,型号:PLCO 型;低温离心机,型号:5810 R 型;722 光栅分光光度计,型号:96306J031。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 将 84 只 Wistar 大鼠常规喂养 7 d 后,随机分为 7 组,即正常对照组、模型对照组、旋覆代赭汤全方组及拆方各组(包括苦降组、甘升组、升降相因组)、西药组,每组 12 只大鼠。

1.2.2 模型制备 造模各组于术前 24 h 均禁食不禁水,采用邹方明等^[10]的“4.2 mm 幽门夹+胃底 2/3 结扎术”造模方法;正常对照组行假手术,即麻醉后开腹,将胃及十二指肠提出,约 10 min 后关腹。各组术后 24 h 禁食不禁水,术后 3 日每日腹腔内注入盐酸左氧氟沙星注射液 1.5 mg/kg 预防感染。

1.2.3 药品制备 旋覆代赭汤按照《伤寒论》原方剂量换算,全方组成为旋覆花 15 g、代赭石 5 g、清半夏 10 g、生姜 25 g、人参 10 g、炙甘草 15 g、大枣 15

g;苦降组由旋覆花、代赭石组成;甘升组由人参、炙甘草、大枣组成;升降相因组由清半夏、生姜组成。将中药颗粒剂倒入容器内,加热水(水温 80℃~100℃)充分搅拌,调制成 9.6 g·ml⁻¹ 溶液。枸橼酸莫沙比利片与兰索拉唑肠溶片按照药品说明书用量,研成极细粉末,配制成浓度为 0.15 mg/ml 的混悬液后装瓶。上述药物均置 4℃ 冰箱备用。

1.2.4 药物干预 正常对照组与模型组于术后 7 d 用生理盐水灌胃,各治疗组于术后 7 d 用相应药液灌胃,均按照 100 g 体重 1 ml 的比例进行,每日 2 次,共灌胃 14 d 后将各组动物处死进行指标检测。

1.2.5 动物取材 各组大鼠处死前 24 h 禁食不禁水,麻醉后常规开腹迅速取出胃-食管交界上 0.5 cm 处向咽喉部截取 1.5~2.0 cm 长食管,食管腔用冰生理盐水漂洗,将食管组织纵切成三份,一份放入 3% 戊二醛固定液中,置于 4℃ 的冰箱内备用以制作线粒体超微结构切片;一份称重后用生理盐水制备 10% 食管匀浆,4℃,3500 r/min,离心 15 min,取上清;另一份放入 10% 福尔马林固定液中送病理室。

1.2.6 指标检测 一般状况观察每日记录大鼠的死亡率、体重、饮水变化量、皮毛、精神状态及活动情况。

食管黏膜大体表现及镜下病理观察各组大鼠开腹取出食管组织,用冰生理盐水漂洗后,首先肉眼观察大体表现并进行 RE 分级,然后取食管下段小块组织放入 10% 福尔马林中,常规制备病理切片,HE 染色后在光镜下观察,并进行 RE 病理分级(两者均采用 2003 年《反流性食管炎诊断及治疗指南》中标准)^[11]。

食管线粒体超微结构观察食管组织取下后放入 3% 的戊二醛固定液中,用锋利手术刀片将组织修成 1 mm³ 小块,放入 1% 锇酸中固定 2 h;50%、70%、90%、100% 梯度丙酮进行逐级脱水,每次 10 min;将丙酮/Epon812 以 2/1、1/1 的浓度配制成渗透液,对组织切块进行逐级渗透,每次 1 h;将组织在 Epon812 包埋剂中渗透 1 h 后取出放入模具中,黏膜层朝向模块的尖端,加入 Epon812 包埋剂,在 68℃ 烤箱中烤 48 h;制成组织切片模块后,运用莱

卡(LEICA)超薄切片机修整模块并在水流层中进行超薄切片,切片厚度约为 50-60 nm;铜网固定切片,用醋酸双氧铀、柠檬酸铅双重染色,在日立(H-7650)透射电子显微镜下进行观察食管黏膜细胞间隙和细胞间桥粒、半桥粒等紧密连接及细胞内部结构改变。

食管组织 SDH 活性的检测食管组织保存于液氮中,在样本检测前经滤纸拭干,准确称重,以 0.9% NaCl 溶液制备成 10% (100 mg:1 ml) 组织匀浆,离心(3000 转/分,15 min)后,取匀浆上清液,再加生理盐水稀释成 1%,并用考马斯亮兰法测定组织蛋白,然后严格按照试剂盒说明书要求,应用化学法测定食管组织 SDH 活性的表达情况。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 13.0 统计软件处理,实验数据为计量资料者,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组与组之间比较采用成组 *t* 检验;实验数据为计数资料者,采用行×列 χ^2 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

一般情况:造模后 22 d,大鼠共死亡 12 只,各组具体死亡情况(见表 1)。实验前各组大鼠体重无显著性差异,实验后各模型组大鼠体重明显低于实验前,与正常对照组比较也明显降低,差异有显著性($P < 0.01$);灌胃后 14 天后,全方组、西药组恢复最好,与模型组相比有显著性差异($P < 0.05$),苦降组较模型组稍升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$),与全方组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);正常组与其他各组比较,均有显著性差异($P < 0.05$)(见表 2)。

食管黏膜大体表现及镜下病理改变模型组与正常组比较:肉眼表现积分及镜下病理积分均明显升高,有显著性差异($P < 0.01$);全方组、西药组较模型组肉眼积分和病理积分均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),甘升组、升降相因组、苦降组三组之间肉眼积分无显著性差异,但与其他各组比较均有显著差异($P < 0.05$),而甘升组、升降相因组两组之间病理积分无显著性差异,但与其他各组比较均有显著性差异($P < 0.05$)详见表 3、表 4。

表 1 造模后 22 天处死前各组大鼠死亡原因分析

组别	例数	死亡数	幽门梗阻	肠梗阻	腹腔感染	吸入性肺炎
正常组	12	0	0	0	0	0
模型组	12	3	1	1	1	0
西药组	12	1	1	0	0	0
全方组	12	1	0	0	1	0
甘升组	12	2	1	0	0	1
苦降组	12	3	1	0	1	1
升降相因组	12	2	1	0	1	0

表2 实验前后各组大鼠体重变化情况

g, $\bar{x} \pm s$

实验分组	实验前体重	实验后体重	实验前后体重变化
正常组	219.8±8.4	246.6±14.2	26.8±4.4
模型组	219.9±8.7	163.0±8.5	-56.8±4.6 ³⁾
西药组	218.4±9.2	205.8±10.1	-12.7±5.7 ¹⁾
全方组	219.2±10.5	209.6±6.4	-9.7±4.5 ¹⁾
甘升组	220.1±10.2	184.5±8.9	-35.6±5.6 ¹⁾²⁾
苦降组	219.3±12.0	163.8±10.5	-55.4±6.3 ²⁾
升降相因组	218.3±11.6	183.4±8.7	-34.8±5.1 ¹⁾²⁾

与模型组比较,¹⁾ P<0.05;与全方组比较,²⁾ P<0.05;与正常组比较,³⁾ P<0.01。

表3 各组大鼠食管黏膜肉眼分级及积分

$\bar{x} \pm s$

组别	0级	I a级	I b级	II级	III级	积分
正常组	9	1	0	0	0	0.10±0.30
模型组	0	0	1	4	2	2.21±0.57 ³⁾
西药组	4	2	2	1	0	0.78±0.79 ¹⁾
全方组	4	2	3	0	0	0.72±0.71 ¹⁾
甘升组	0	3	5	0	0	1.31±0.26 ¹⁾²⁾
苦降组	0	2	4	1	0	1.43±0.35 ¹⁾²⁾
升降相因组	0	1	5	2	0	1.56±0.32 ¹⁾²⁾

与模型组比较,¹⁾ P<0.05;与全方组比较,²⁾ P<0.05;与正常组比较,³⁾ P<0.01。

表4 各组大鼠食管黏膜病理分级及积分

只, $\bar{x} \pm s$

组别	例数	正常	轻度	中度	重度	积分
正常组	10	10	0	0	0	0.00±0.00
模型组	7	0	0	1	6	2.86±0.38 ³⁾
西药组	9	5	4	0	0	0.67±0.50 ¹⁾
全方组	9	4	5	0	0	0.56±0.53 ¹⁾
甘升组	8	1	2	5	0	1.50±0.76 ¹⁾²⁾
苦降组	7	0	0	2	5	2.71±0.49 ²⁾
升降相因组	8	1	0	7	0	1.75±0.71 ¹⁾²⁾

与模型组比较,¹⁾ P<0.05;与全方组比较,²⁾ P<0.05;与正常组比较,³⁾ P<0.01。

食管黏膜线粒体超微结构改变透射电镜下观察发现,食管黏膜线粒体超微结构病变最常见的是线粒体数量(详见表5)和结构的改变。正常组线粒体呈椭圆形或杆状,结构清晰,细胞线粒体丰富,形态大小正常,线粒体内膜向内折叠而成嵴,内膜及外膜清晰、结构良好,嵴排列整齐,线粒体基质致密,未见肿胀、空泡、浓缩和巨线粒体;模型组线粒体稀少,形态异常,大小不均,内膜及外膜断续模糊、增厚,嵴不规则,多数线粒体嵴排列紊乱,甚至部分线粒体膜和嵴完全崩解、断裂、溶解,大部分线粒体基质浅淡,多数线粒体肿胀、呈空泡化,偶尔可见巨线粒体;全方组与西药组线粒体丰富,形态正常,大小均匀,膜和嵴比较清晰,嵴排列整齐,线粒体基质致密,未见线粒体空泡、浓缩等明显损伤;甘升组与苦降组线粒体数量相对较少,形态大小不太均匀,线粒体包膜尚清晰,部分嵴断续模糊,线粒体基质尚致密,未见肿胀、

空泡化和巨线粒体;升降相因组线粒体数量中等,形态大小尚均,部分线粒体包膜和嵴显示不清晰,可见少许包膜和嵴断裂,局部线粒体基质密度降低,未见肿胀、空泡化和巨线粒体。

表5 各组大鼠线粒体数目

$\bar{x} \pm s$

实验分组	例数	线粒体数目(个/高倍视野)
正常组	10	15.00±1.15
模型组	7	2.00±0.58 ³⁾
西药组	9	10.56±1.01 ¹⁾
全方组	9	10.56±1.13 ¹⁾
甘升组	8	6.00±0.76 ¹⁾²⁾
苦降	7	2.43±0.79 ²⁾
升降相因组	8	5.50±0.92 ¹⁾²⁾

与模型组比较,¹⁾ P<0.05;与全方组比较,²⁾ P<0.05;与正常组比较,³⁾ P<0.01。

食管组织 SDH 活性模型组食管组织 SDH 活性与较正常组显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);全方组、西药组 SDH 活性较模型组明显提高,差异有统计学意义($P < 0.05$),升降相因组与甘升组两组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),但较其他各组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$);苦降组与全方组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 6 各治疗组对 RE 大鼠食管组织 SDH 活性的影响

实验分组	例数	SDH/(U/mgprot)
正常组	10	14.06 ± 1.33
模型组	7	1.30 ± 0.62 ³⁾
西药组	9	9.95 ± 0.96 ¹⁾
全方组	9	10.07 ± 1.14 ¹⁾
甘升组	8	4.73 ± 1.06 ¹⁾²⁾
苦降	7	1.61 ± 0.80 ²⁾
升降相因组	8	4.44 ± 0.83 ¹⁾²⁾

与模型组比较,¹⁾ $P < 0.05$;与全方组比较,²⁾ $P < 0.05$;与正常组比较,³⁾ $P < 0.01$ 。

3 讨论

本实验通过手术方法制造酸碱混合反流 RE 大鼠模型,运用拆方研究法观察旋覆代赭汤对于 RE 模型大鼠一般情况、食管病理形态、食管组织线粒体结构及 SDH 活性的影响,结果发现全方能够明显增加线粒体数量,减少线粒体结构及食管黏膜损伤,且提高食管组织线粒体中 SDH 的活性,促进线粒体能量 ATP 的生成代谢,为食管黏膜修复创造了条件。且凡是含有甘升组者皆对促进线粒体能量代谢 ATP 的生成起正性作用。旋覆代赭汤具有益气健脾,降逆化痰的功效,可调节脾胃气机升降,该研究从新的科学角度探讨了线粒体能量代谢与旋覆代赭汤作用机制的相关性,不仅进一步验证了 RE 的关键病机是“胃虚气逆”,也为寻求治疗 RE 的新的

药物靶点和方法提供了有利的理论依据和指导。

参考文献

- [1] 陈灏珠. 实用内科学[M]. 12 版. 北京:人民卫生出版社,2006:1849-1850.
- [2] EL-SERAG HB, SWEET S, WINCHESTER CC, et al. Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease:a systematicreview. [J]. Gut, 2014, 63: 871-880.
- [3] ESTORES D, VELANOVICH V. Barrett esophagus: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management[J]. CurrProblSurg, 2013, 50:192-192.
- [4] DENVER P, DONNELLY M, MURRAY L J, et al. Psychosocialfactors and their association with reflux oesophagitis, Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19: 1770-1770.
- [5] CREMONINI F, ZIOGAS DC, CHANG HY, et al. Meta-analysis:the effects of placebo treatment on gastro-oesophageal reflux disease[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2010, 32:29-42.
- [6] BAVISHI C, DUPONT HL. Systematic review: the use of proton pump inhibitors and increased susceptibility to enteric infection[J]. Aliment Pharmacol Ther. 2011, 34:1269-1281.
- [7] VIGNERI S, TERMINI R, LEANDRO G, et al. A comparison of five maintenance therapies for reflux esophagitis[J]. N Engl J Med. 1995, 333:1106-1110.
- [8] CICALA M, EMERENZIANI S, GUARINO MP, et al. Proton pump inhibitor resistance, the real challenge in gastro-esophageal reflux disease[J]. World J Gastroenterol, 2013, 39:6529-6535.
- [9] 张宽朝, 姬惠惠. 琥珀酸脱氢酶的提取与活力测定的研究进展[J]. 中国中医药杂志, 2007, 5(10):32-33.
- [10] 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]. 福建:福建医科大学;2012.
- [11] 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, 9(4):4-5.