

# 健脾疏肝方对反流性食管炎大鼠模型食管组织病理及PCNA的影响

李春婷, 沈水杰, 杜斌, 滑永志, 蒋凤荣, 印勇

李春婷, 沈水杰, 杜斌, 滑永志, 蒋凤荣, 印勇, 南京中医药大学中医内科教研室 江苏省南京市 210029  
江苏省高校自然科学研究计划项目, No. 03KJB360100  
通讯作者: 李春婷, 210029, 江苏省南京市汉中中路282号61信箱, 南京中医药大学中医内科教研室. xt010503@sina.com  
电话: 025-85811644  
收稿日期: 2006-12-11 接受日期: 2007-01-05

## Effect of liver-soothing and spleen-strengthening decoction on esophageal pathology and proliferating cell nuclear antigen expression in rats with reflux esophagitis

Chun-Ting Li, Shui-Jie Shen, Bin Du, Yong-Zhi Hua, Feng-Rong Jiang, Yong Yin

Chun-Ting Li, Shui-Jie Shen, Bin Du, Yong-Zhi Hua, Feng-Rong Jiang, Yong Yin, Department of Traditional Chinese Internal Medicine, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by the Natural Science Research Foundation of Jiangsu Provincial Higher Education, No. 03KJB360100  
Correspondence to: Chun-Ting Li, Department of Traditional Chinese Internal Medicine, 282 Hanzhong Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. xt010503@sina.com  
Received: 2006-12-11 Accepted: 2007-01-05

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of liver-soothing and spleen-strengthening (LSSS) decoction on esophageal pathology and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in rats with reflux esophagitis.

**METHODS:** Partial pylori ligation plus cardiomyotomy was used to establish the rat models of reflux esophagitis. A total of 240 rats were divided into 7 groups, including normal group, model group, placebo group, positive control group, and Chinese medicine groups (high-, moderate-, and low-dose group). After treatment with the corresponding methods, HE staining was performed to observe the pathological changes of esophageal tissues, while the expres-

sion of PCNA was measured by immunohistochemistry.

**RESULTS:** LSSS decoction remarkably alleviated the esophageal pathological changes, the pathological score was significantly different between high-dose LSSS decoction group and model group. As compared with that in model group, the expression of PCNA was significantly decreased in LSSS decoction groups (low dose:  $284.83 \pm 30.49$  vs  $330.00 \pm 35.35$ ,  $P < 0.05$ ; moderate dose:  $239.67 \pm 28.84$  vs  $330.00 \pm 35.35$ ,  $P < 0.01$ ; high dose:  $203.00 \pm 25.29$  vs  $330.00 \pm 35.35$ ,  $P < 0.01$ ). There was no marked difference between LSSS decoction groups and positive control group.

**CONCLUSION:** LSSS decoction may restrain the high expression of PCNA while alleviate the symptoms and esophageal inflammation of reflux esophagitis.

**Key Words:** Liver-soothing and spleen-strengthening decoction; Reflux esophagitis; Proliferating cell nuclear antigen

Li CT, Shen SJ, Du B, Hua YZ, Jiang FR, Yin Y. Effect of liver-soothing and spleen-strengthening decoction on esophageal pathology and proliferating cell nuclear antigen expression in rats with reflux esophagitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(7):733-736

## 摘要

**目的:** 观察健脾疏肝方对反流性食管炎大鼠模型食管组织病理及增殖细胞核抗原(PCNA)表达的影响。

**方法:** 采用“不全幽门结扎+贲门肌切开术”制作动物模型, 240只大鼠分为正常组、模型组、安慰剂(谷维素)组、阳性对照组(加斯清)、治疗高、中、低剂量组。给予相应处理后, 取食管组织行HE染色, 光镜下观察组织病理学变化, 用免疫组化的方法测PCNA表达。

**结果:** 健脾疏肝方能显著改变反流性食管炎

## ■背景资料

反流性食管炎(RE)是指因食管胃连接部防反流机构障碍而导致胃或肠内容物反流入食管, 从而引起食管炎症, 临床上多表现为胸骨后灼热、疼痛, 反酸、嗝气, 恶心呕吐等症状, 属中医“吐酸”、“噎膈”、“胃脘痛”等范畴, 目前西医治疗尚无明显进展, 仍局限于制酸药、动力药和黏膜保护剂等, 如奥美拉唑、红霉素、思密达等。而传统中医药在改善症状, 调节食管下段括约肌功能, 抑制反流, 促进食管受损黏膜修复等方面均显示了良好的疗效。

### ■创新盘点

在动物实验研究中,根据国内对反流性食管炎的动物模式的文献报道,本研究采用了手术方法(贲门肌切开+幽门半结扎)造模并加以改进,该方法具有成功率高、动物死亡率低等特点。

的病理变化,健脾疏肝方高剂量组食道组织病理变化明显减轻;健脾疏肝方能显著抑制PCNA表达的升高,与模型组相比PCNA的表达显著降低(小剂量:  $284.83 \pm 30.49$  vs  $330.00 \pm 35.35$ ,  $P < 0.05$ ; 中剂量:  $239.67 \pm 28.84$  vs  $330.00 \pm 35.35$ ,  $P < 0.01$ ; 高剂量:  $203.00 \pm 25.29$  vs  $330.00 \pm 35.35$ ,  $P < 0.01$ ),其疗效与加斯清相当。

**结论:** 健脾疏肝方有助于降低PCNA的高表达,并有抗胃食管反流,减轻食管炎症的疗效。

**关键词:** 健脾疏肝方; 反流性食管炎; 增殖细胞核抗原

李春婷, 沈水杰, 杜斌, 滑永志, 蒋凤荣, 印勇. 健脾疏肝方对反流性食管炎大鼠模型食管组织病理及PCNA的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(7):733-736

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/733.asp>

## 0 引言

反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)是指由于胃与食管交界处抗反流屏障功能障碍而导致的胃或十二指肠内容物反流入食管,引起食管组织黏膜损害<sup>[1]</sup>. 本病属于胃食管反流病(gastroesophageal reflux diseases, GERD)范畴<sup>[2]</sup>, 具有慢性复发倾向,严重影响人民的身体健康和和生活质量,日益受到中外医学者的重视. 目前西药治疗存在维持治疗时间长,副作用较大<sup>[3]</sup>,患者经济负担较重以及停药后易复发的不足. 我们在临床实践中,依据反流性食管炎脾虚肝郁,胃气上逆的常见中医病机<sup>[4]</sup>,拟定健脾疏肝为基本治则,并组成方剂,取得较为理想的临床疗效,为进一步阐明其作用机制,我们观察了该方对反流性食管炎大鼠模型食管组织病理及增殖细胞核抗原(PCNA)表达的影响,报告如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康♀SD大鼠240只,体质量200-250 g,由南京中医药大学动物中心提供. 健脾疏肝方方剂由半夏、厚朴、醋柴胡、白芍、苏叶、生苡仁、茯苓等组成,南京中医药大学动物实验中心制备,水煎后浓缩配制,配成低210 g/L、中430 g/L、高850 g/L的浓度;加斯清: 5 mg/片,用蒸馏水配成浓度为0.11 g/L<sup>[5]</sup>,日本制药株式会社生产,批号: 530202;谷维素: 10 mg/片,用蒸馏水配成浓度为0.23 g/L,浙江昂利康制药有限公司,批号: 5T1D09. 谷维素及加斯清组药物浓度均为人等效剂量的2倍,中药组低、中、高剂量组为

表 1 RE病理学评分标准

病变	10分	8分	6分	4分	2分	0分
黏膜层血管增生充血	-	+	+	+	+	+
鳞状上皮增生	-	-	+	+	+	+
黏膜固有层乳头延伸	-	-	+	+	+	+
黏膜层炎症细胞浸润	-	+	+	+	+	+
上皮细胞层炎症细胞浸润	-	-	-	-	+	+
黏膜糜烂	-	-	-	-	+	+
黏膜溃疡	-	-	-	-	-	+

+++~++++均记为6分。

人等效剂量的2倍、4倍、8倍<sup>[6]</sup>. PCNA试剂: 兔抗鼠PCNA多克隆抗体、SABC试剂盒、DAB显色试剂盒为武汉博士德生物有限公司提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 造模** 参照于强 *et al*<sup>[7]</sup>方法制作并改进,造模前大鼠适应环境4-7 d,术前禁食24 h,按30 mg/kg, ip 10 g/L戊巴比妥钠溶液进行麻醉. 将大鼠固定于鼠板,取上腹部正中切开进腹,分离贲门及胃,缝合血管,纵行切开贲门肌0.5 cm至黏膜层,而后分离幽门,半结扎幽门. 关腹前腹腔注入生理盐水1 mL及庆大霉素2万IU,术后禁食24 h,不禁水. 观察大鼠饮食、粪便及活动情况,每周测定体质量,术后3 wk即造模完成。

**1.2.2 分组给药** 预留12只作为正常组,其余大鼠按照以上方法进行造模,造模完成后将大鼠随机分为: 模型组、安慰剂组、阳性对照组、中药高剂量组、中药中剂量组、中药低剂量组. 正常组不治疗,其他模型各组分别给予NS、谷维素、加斯清、中药高剂量、中药中剂量、中药低剂量灌胃,10 mL/kg,每天一次,连续给药3 wk。

**1.2.3 取食管组织** 末次给药24 h后,断髓处死大鼠,取下食管组织,纵行剖开,作大体形态观察,按反流性食管炎诊断及治疗方案(试行)(1999年烟台标准)标准进行分级<sup>[8]</sup>. 观察完后将标本放入40 g/L甲醛固定后常规HE染色,光镜下观察组织病理学变化(表1)。

**1.2.4 PCNA免疫方法及主要实验步骤** 采用ABC法<sup>[9]</sup>,主要步骤如下: (1)石蜡切片于二甲苯及阶梯浓度酒精中脱蜡至水; (2)过氧化氢溶液室温孵育10 min封闭内源性过氧化物酶; (3)加入血清白蛋白置湿盒内室温孵育20 min; (4)切片加第一抗体PCNA,置湿盒内于4℃冰箱内孵育,过夜; (5)加入第二抗体,湿盒内室温孵育45 min; (6)加入SABC溶液,湿盒内室温孵育20 min; (7)DAB

表 2 食道组织病理积分比较(只)

分组	10分	8分	6分	4分	2分	0分	合计(分)
正常	12	0	0	0	0	0	120
模型 <sup>a</sup>	0	0	0	8	2	2	36
安慰剂组	0	0	0	6	4	2	32
阳性对照	6	0	2	2	2	0	84
小剂量组	2	2	0	4	2	0	56
中剂量组	4	2	2	4	0	0	84
高剂量组 <sup>c</sup>	8	0	2	2	0	0	100

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 正常组; <sup>c</sup> $P<0.05$  vs 模型组, 西药对照组与中剂量、大剂量组比较无显著性差异。

显色剂显色; (8)阶梯浓度酒精脱水, 二甲苯透明, 树胶封片, 观察结果. PCNA: 阳性着色定位于细胞核, 细胞核被染成棕黄色或褐色, 呈颗粒型或弥漫型. 食管上皮组织均出现不同程度的细胞PCNA免疫组化阳性反应, 免疫阳性细胞主要位于基底细胞层的第1-2层和乳头区基底细胞. 计算方法: 每个高倍视野计算阳性细胞, 然后计算出单位面积的阳性细胞数, 任选12个视野.

**统计学处理** 应用SPSS12.0统计软件, 统计方法采用单因素方差分析, 进行组间的两两比较.

## 2 结果

**2.1 大体标本观察** 从反流性食管炎造模后取材病理观察, 对照1999-12中华医学会消化内镜学会颁布的RE病理诊断标准<sup>[9]</sup>. 证实反流性食管炎造模成功. 模型组主要表现为食管黏膜发红、糜烂或溃疡; 药物组与模型组有明显的病理学改变.

**2.2 HE染色** 正常大鼠黏膜除上皮细胞层内间或存在少量炎细胞外, 无其他异常表现. 安慰剂组: 与模型组相似. 模型组: 大鼠黏膜上皮细胞层内出现炎性细胞浸润, 鳞状上皮增生, 黏膜固有层乳头延伸, 成纤维细胞增多, 严重者出现黏膜糜烂、溃疡形成. 阳性对照组: 大鼠黏膜上皮细胞层内出现少量的炎性细胞浸润, 偶见黏膜糜烂. 中药低剂量组: 大鼠黏膜上皮细胞层内出现淋巴细胞及中性白细胞浸润, 鳞状上皮增生, 黏膜固有层乳头延伸, 并出现黏膜糜烂、溃疡形成. 中药中剂量组: 大鼠黏膜上皮细胞层内出现少量的淋巴细胞及中性白细胞浸润, 并出现黏膜糜烂、溃疡形成. 中药高剂量组: 大鼠黏膜上皮细胞层内散在的淋巴细胞及中性白细胞浸润, 鳞状上皮

表 3 各组食管组织PCNA的表达(mean  $\pm$  SD,  $n=12$ )

分组	PCNA的阳性细胞数(个)
正常组	187.50 $\pm$ 21.91 <sup>d</sup>
模型组	330.00 $\pm$ 35.35 <sup>b</sup>
安慰剂组	299.33 $\pm$ 23.79 <sup>b</sup>
阳性对照组	234.00 $\pm$ 39.24 <sup>ad</sup>
小剂量组	284.83 $\pm$ 30.49 <sup>bc</sup>
中剂量组	239.67 $\pm$ 28.84 <sup>bd</sup>
高剂量组	203.00 $\pm$ 25.29 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 正常组; <sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$  vs 模型组.

轻度增生(食道组织病理积分比较如表2).

**2.3 免疫组化结果** PCNA在安慰剂组、阳性对照组、小剂量组、中剂量组的表达与正常组差异显著, 正常组、阳性对照组、中剂量组及小剂量组中PCNA的表达显著低于模型组(表3).

## 3 讨论

PCNA是目前反应组织细胞增殖功能的指标之一, 其过度表达是细胞增殖的重要标志<sup>[10]</sup>. PCNA是存在于细胞核内DNA聚合酶的一种附属蛋白质, 对细胞G1期向S期过渡起重要的调节作用<sup>[11]</sup>处于增殖状态的细胞, 其PCNA的表达明显增强. 这表明PCNA与细胞增殖状态有关. 叶萍 *et al*<sup>[12]</sup>研究表明正常食管黏膜组织中PCNA阳性反应很弱, 仅占8%(<10%), 认为是一种不活跃的基因表达形式. 食管黏膜在刺激物的作用下, 增生细胞不断分化、增殖并随着炎症的加重, 表达率也逐渐地增加. 在细胞的异常增生或不典型增生和肠化生中, PCNA发挥着重要的作用. 因此, PCNA的阳性表达在反流性食管炎中具有重要的作用, PCNA的临床随访监测将对胃

### ■应用要点

健脾疏肝方有助于降低PCNA的高表达, 并有抗胃食管反流, 减轻食管炎症的疗效. 疗效与阳性对照加斯清相当, 都具有明显减轻食管炎症, 降低PCNA的高表达, 抑制细胞的异常增生或不典型增生和肠化的作用. 中医药为治疗和预防反流性食管炎提供了确实可靠的治疗方法, 必将在胃食管反流病的治疗中发挥日趋重要的作用.

#### ■同行评价

本文研究了健脾疏肝方对反流性食管炎大鼠模型食管组织病理及PCNA的影响,立题有依据,实验方法先进、规范、科学,难度较大,结果可靠,文章简洁,论点明确,条理性强。

食管反流病(GERD)患者的疗效和预后估价具有重要意义<sup>[12-13]</sup>。根据临床表现RE多属于中医学“胸痛”、“反胃”、“嘈杂”、“泛酸”、“胃痛”、“噎膈”等范畴<sup>[14]</sup>。在病因病机方面,多数学者认为本病是由于各种因素造成气机升降失常,胃气上逆所致。临床辨证分型有肝胃不和、肝胃郁热、痰气交阻、脾胃虚寒、脾胃阴虚等,学者们更加注重其中肝胃不和、肝胃郁热、脾胃虚寒3型<sup>[15]</sup>。在治疗上强调疏肝理气,和胃降逆,清热和中。我们在长期的临床实践中认识到反流性食管炎的中医病机主要为肝胆失于疏泄,脾胃升降失调,胃气上逆所致;因此,我们根据健脾疏肝的治疗原则组方,方中柴胡疏肝理气,配伍白芍、苏叶和中降逆、行气宽中,生薏仁、茯苓健脾益气,培补中焦;半夏和胃降逆;厚朴燥湿消痰,下气除满;诸药协同使用,使气机得以平和和顺,脾胃功能得以恢复,症状消除。现代药理研究表明,厚朴主要成分厚朴酚对实验性溃疡有防治作用,半夏、茯苓具有显著的抑制胃液分泌的作用,苡仁、白芍能调节胃肠运动、抗溃疡、增加免疫功能。健脾疏肝方有助于降低PCNA的高表达,并有抗胃食管反流,减轻食管炎症的疗效。疗效与阳性对照加斯清相当,都具有明显减轻食管炎症,降低PCNA的高表达,抑制细胞的异常增生或不典型增生和肠化的作用。中药治疗组与剂量无绝对相关性,高中剂量疗效优于低剂量但无法说明疗效与剂量成正相关,低剂量组疗效不佳,可能是药物浓度偏低,行气降逆乏术造成。全方标本兼顾,配伍合理,疏肝不忘健脾,行气慎防伤阴,共奏健脾疏肝,行气降逆之功。

总之,中医药为治疗和预防反流性食管炎提供了确实可靠的治疗方法,必将在胃食管反流病的治疗中发挥日趋重要的作用。

#### 4 参考文献

- 1 李军杰, 郑勇. 胃肠激素与反流性食管炎. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1493-1497
- 2 王虹, 刘宾. 胃食管反流性疾病的研究回顾. 世界华人消化杂志 2001; 9: 1041-1044
- 3 陈欣童, 黄晓军, 陈威. 中西医结合用药治疗反流性食管炎疗效观察. 现代预防医学 2006; 33: 112-113, 115
- 4 高祥华, 李春婷. 反流性食管炎的中医病机及辨治探讨. 吉林中医药 2004; 24: 15-16
- 5 刘东, 刘宇, 刘喆隆, 张冬林, 裴琳, 刘昇, 汪震. 枸橼酸莫沙必利口服液与片剂人体生物等效性评价. 中国医院药学杂志 2006; 26: 1208-1210
- 6 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 郑青山, 孙瑞元. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算. 中国临床药理学与治疗学 2004; 9: 1069-1072
- 7 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. 中国中西医结合消化杂志 2002; 10: 74-75
- 8 中华医学会消化内镜学会、中华消化内镜杂志编辑部. 反流性食管病(炎)诊断及治疗方案(试行). 中华消化内镜杂志 1999; 16: 326
- 9 王和明, 曹秀峰, 张群华, 黄水清, 李义生, 袁爱华, 朱斌, 张延龄. 胃泌素及其受体拮抗剂对胃癌细胞PCNA、p53基因表达的影响. 中华实验外科杂志 2004; 21: 546
- 10 孟华, 刘丽娜, 孟晓光. 胃癌及癌前病变中的PCNA、p53表达及其与H pylori感染的关系. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1253-1254
- 11 汪涛, 龚均, 陈谦, 王进海. 大鼠混合反流模型中COX-2、PCNA、CyclinD<sub>1</sub>的表达. 西安交通大学学报(医学版) 2005; 26: 460-462
- 12 叶萍, 李兆申, 许国铭, 倪灿荣, 富克远. 反流性食管炎和食管腺癌组织中P16、P53、PCNA表达及其临床意义. 解放军医学杂志 2000; 25: 326-329
- 13 邹继彬, 黄广恩, 陈鸿莲. 食管癌Survivin和PCNA的表达及其临床意义. 中国医师杂志 2005; 7: 898-899
- 14 戴晓萍, 阎西丽, 王博. 反流性食管炎中医病名、病机及治疗探讨. 安徽中医临床杂志 2002; 14: 223-224
- 15 郭莉, 许喆. 胃食管反流病的中医药认识和研究进展. 江西中医药 2006; 37: 60-61

电编 张敏 编辑 王晓瑜