

旋覆代赭汤加味对胃食管反流性咽喉炎大鼠 咽喉黏膜紧密连接的影响

王颖颖¹ 曹利红² 张春敏¹ 张素钊¹ 戚经天³ 邱贝² 张书霞⁴ 相聪坤⁴ 杜昕⁵

河北省中医院¹ 针灸科, ² 脑病科, ⁴ 药学部, ⁵ 耳鼻喉科, 河北石家庄 050011;

³ 天津南开医院中医科, 天津 300193

通信作者: 杜昕, Email: duxinyan0603@163.com

【摘要】 目的 观察旋覆代赭汤加味对胃食管反流性咽喉炎(LPRD)大鼠咽喉黏膜紧密连接的影响。方法 选择 80 只健康 Wistar 大鼠, 根据随机数字表法分为假手术组、LPRD 模型组、西药对照组和中药治疗组, 每组 20 只。采用改进的不全幽门缝扎+食管下括约肌切开术制备 LPRD 模型; 假手术组开腹 15 min 后即关腹, 不进行其他操作。假手术组和 LPRD 模型组均给予生理盐水 10 mL/kg 灌胃, 每日 2 次; 西药对照组给予 5 mL/kg 奥美拉唑混悬液, 以 10 mL/kg 体质量灌胃, 每日 2 次; 中药治疗组给予旋覆代赭汤加味浓缩药液 10 mL/kg 灌胃, 每日 2 次。观察大鼠一般情况, 于治疗 14 d 处死大鼠, 取咽部以及食管组织进行检测。观察各组大鼠咽部及食管组织大体形态变化和病理学改变, 电镜下观察各组大鼠咽喉黏膜超微结构以及紧密连接 claudin 蛋白表达情况。**结果** 与 LPRD 模型组相比, 西药对照组和中药治疗组大鼠的体质量增长较明显, 毛色光亮程度有所恢复, 精神好转, 进食量逐渐增多, 排泄量增多。LPRD 模型组咽部黏膜病理改变最明显; 西药对照组和中药治疗组较 LPRD 模型组咽部黏膜病理改变程度轻, 假手术组无咽部黏膜病理改变。电镜观察显示, 假手术组大鼠咽部黏膜的上皮细胞侧面可见紧密连接, 且大部分细胞胞膜或胞质内出现棕褐色颗粒, 蛋白表达较强; LPRD 模型组表达最弱, 上皮细胞可见紧密连接蛋白表达薄弱, 极少部分细胞可见阳性表达; 西药对照组和中药治疗组 claudin 蛋白表达均强于 LPRD 模型组, 但弱于假手术组, 部分细胞可见蛋白表达。与假手术组相比, LPRD 模型组大鼠 claudin 蛋白表达评分明显降低(分: 1.33 ± 0.48 比 3.35 ± 0.67 , $P < 0.05$); 西药对照组和中药治疗组 claudin 蛋白表达均较 LPRD 模型组明显升高(分: 2.42 ± 0.51 、 2.74 ± 0.45 比 1.33 ± 0.48 , 均 $P < 0.05$), 且以中药治疗组升高最明显。**结论** 旋覆代赭汤可有效抑制胃食管反流, 减轻 LPRD 大鼠咽部黏膜病理改变, 并有效保护紧密连接, 增加 claudin 蛋白表达, 有效防御反流液损伤咽部黏膜。

【关键词】 旋覆代赭汤加味; 胃食管反流性咽喉炎; 大鼠模型; 紧密连接; claudin 蛋白

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(H2015423064); 河北省高层次人才资助项目(A2017002086); 河北省中医药管理局科研计划项目(2020035); 天津市科委科技支撑项目计划(12ZCZDSY01500)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2021.03.022

Effect of modified Xuanfu Daizhe Decoction on tight junction of throat mucosa in rat model of gastroesophageal reflux laryngopharyngitis Wang Yingying¹, Cao Lihong², Zhang Chunmin¹, Zhang Suzhao¹, Qi Jingtian³, Qiu Bei², Zhang Shuxia⁴, Xiang Congkun⁴, Du Xin⁵

¹Department of Acupuncture, Hebei Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, Hebei, China;

²Department of Encephalopathy, Hebei Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, Hebei, China;

³Department of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300193, China; ⁴Department of Pharmacy, Hebei Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; ⁵Department of Otorhinolaryngology, Hebei Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, Hebei, China

Corresponding author: Du Xin, Email: duxinyan0603@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of modified Xuanfu Daizhe Decoction on the tight junction of laryngopharyngeal mucosa in the rat model of gastroesophageal reflux laryngopharyngitis disease (LPRD). **Methods** Eighty healthy Wistar rats were randomly divided into 4 groups: sham operation group, LPRD model group, traditional Chinese medicine treatment group and Western medicine control group (20 rats in each group). The LPRD model was established by the improved method of "incomplete pylorus suture ligation + lower esophageal sphincterotomy". Laparotomy was performed in the rat of sham operation group for 15 minutes, and then the abdomen was closed without any other operative procedure being done. Each rat in sham operation group and LPRD model group was given 10 mL/kg body weight of normal saline by gavage, twice a day; each rat in Western medicine control group was given 5 mL/kg omeprazole suspension, with 10 mL/kg body weight for gavage, twice a day; each rat in the traditional Chinese medicine treatment group was given modified concentrated Xuanfu Daizhe Decoction 10 mL/kg body weight by gavage, twice a day. The general situations of rats in various groups were observed, and after 14 days, the rats in each group were sacrificed, and the pharynx and esophageal tissues were taken out for investigations. The general morphological and pathological changes of pharyngeal and esophageal tissues were observed, and under the electron microscope, the ultrastructure and tight junction claudin protein expression situation of pharyngeal and laryngeal mucosa in various groups were investigated. **Results** Compared with LPRD model group, the body weight of rats increased significantly, the brightness of hair color was recovered, the spirit was improved, the food intake was elevated gradually and the excreta amount increased in the Western medicine control group and traditional Chinese medicine treatment group. The pathological changes of the pharyngeal mucosa in the LPRD model group were the

most obvious; the pathological changes of the pharyngeal mucosa in the traditional Chinese medicine treatment group and the Western medicine control group were lighter than those in the LPRD model group, and there was no pathological change of the pharyngeal mucosa in the sham operation group. The electron microscopic examinations showed that the tight junctions could be seen on the epithelial cell lateral sides of the pharyngeal mucosa in the sham operation group, and the brown granules with relatively high expression appeared in the membrane or cytoplasm of most of the cells; in LPRD model group, the tight junction protein expression in the epithelial cells was the lowest, and only in a few cells its expression was positive; in Western medicine control group and traditional Chinese medicine treatment group, the claudin protein expression could be seen which was higher than that in LPRD model group, but lower than that in sham operation group, protein expression could be observed in some cells. The expression of claudin protein in the LPRD model group was lower than that in the sham operation group (1.33 ± 0.48 vs. 3.35 ± 0.67 , $P < 0.05$), the expressions of claudin protein in the traditional Chinese medicine treatment group and the Western medicine control group were higher than those in the LPRD model group (2.42 ± 0.51 , 2.74 ± 0.45 vs. 1.33 ± 0.48 , both $P < 0.05$), and the most obvious increase was seen in the traditional Chinese medicine treatment group. **Conclusion** The modified Xuanfu Daizhe Decoction can effectively inhibit gastroesophageal reflux, reduce pathological changes of pharyngeal mucosa in rats, validly protect the mucosal epithelial cell tight junction, increase the expression of claudin protein, and efficiently prevent reflux liquid from damaging pharyngeal mucosa.

【Key words】 Xuanfu Daizhe Decoction, modified; Gastroesophageal reflux laryngopharyngitis; Rat model; Tight junction; Claudin protein

Fund program: Hebei Provincial Natural Scientific Fund Project (H2015423064); Hebei Provincial Scientific Research Fund Project for High Talent Engineering Training (A2017002086); Hebei Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine Scientific Research Planning Program (2020035); Tianjing Science Commission Supporting Planning Project of Science and Technology (12ZCZDSY01500)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2021.03.022

胃食管反流性咽喉炎(LPRD)指胃内容物反流至食管上括约肌以上部位(包括咽部、喉部、鼻腔、气管等),造成局部黏膜损伤,表现为咽喉异物感、咳嗽、声嘶等一系列症状的疾病^[1]。LPRD是耳鼻喉科的常见病、多发病,据统计,就诊于耳鼻喉科的患者中有10%存在反流症状和体征^[2]。西医多给予抑酸、促进胃动力药物治疗,但容易复发且不良反应大。中医多认为LPRD与气机关系密切,属胃气虚弱、气机上冲,故临床多用旋覆代赭汤治疗此病,收效甚好^[3-4]。紧密连接广泛存在于上皮或内皮细胞间连接的最顶端,是由多种蛋白构成的大分子复合物,主要具有栅栏(fence)和屏障(barrier)功能^[5],由密封蛋白(occludin)、封闭蛋白(claudin)、胞质紧密连接蛋白(ZO)、连接黏附分子(JAMs)等结构蛋白和各类连接蛋白共同组成^[6]。有临床研究表明,咽喉反流物可以导致紧密连接结构破坏,相关蛋白功能表达异常^[7]。故本研究建立LPRD大鼠模型,分别给予奥美拉唑及中药旋覆代赭汤加味治疗,旨在探讨旋覆代赭汤的疗效以及胃食管反流液与咽喉黏膜和紧密连接claudin蛋白表达的关系,现报告如下。

1 材料与方

1.1 实验动物:选择健康Wistar大鼠80只,雌雄各半,体质量(200 ± 20)g,由河北医科大学动物实验中心提供,动物许可证号:1509118。本实验中动物处置方法符合动物福利与伦理学标准,经河北省中医院医学伦理委员会批准(审批号:20140601)。

1.2 实验药品

1.2.1 西药:奥美拉唑肠溶胶囊(洛赛克,阿斯利康

制药有限公司,国药准字J20030105);配制奥美拉唑混悬液5 mL/kg,以10 mL/kg体质量灌胃,每日2次。

1.2.2 中药:据《伤寒论》第161条原方剂量折算,由旋覆花9g(包煎)、代赭石3g(先煎)、生姜15g、半夏9g、人参6g、炙甘草9g、大枣6g、射干9g、桔梗6g组成。代赭石用200 mL冷水浸泡,其他药物用600 mL冷水浸泡1 h,在煎煮容器中先煎代赭石30 min,再加入其他群药,煮沸30 min后将药液倒出,再加入400 mL冷水煮沸20 min。将2次煎煮液混匀,根据人与动物体表面积换算,将药液浓缩为10 mL/kg灌胃。

1.3 动物分组:80只健康Wistar大鼠给予标准颗粒饲料自由进食以及饮水,适应性喂养7 d后按随机数字表法分为假手术组、LPRD模型组、西药对照组和中药治疗组,每组20只。

1.4 LPRD大鼠模型的制备及处理:采用不全幽门缝扎+食管下括约肌切开术的方法制备LPRD大鼠模型,术前24 h禁食、不禁水,将动物麻醉后固定于手术操作台上,备皮并消毒,腹中线切口,将外直径1.55 mm的金属针由胃体部位穿刺入胃,通过幽门至十二指肠端,避开血管,对金属针外部剩余的幽门进行缝扎后抽出金属针,以保证大鼠模型建立后剩余的幽门内径均匀一致,缝合胃部穿刺点,于食管和胃交界处纵行切开食管下括约肌约0.5 cm分离至黏膜层,以加强胃反流;假手术组开腹15 min后即关腹,不进行其他操作。所有大鼠术后24 h禁食、不禁水,连续3 d给予腹腔注射左氧氟沙星注射液 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 以预防感染。

1.5 给药方法: 术后 7 d 开始给药, LPRD 模型组和假手术组均予生理盐水 10 mL/kg 灌胃, 每日 2 次; 西药对照组予 5 mL/kg 奥美拉唑混悬液, 以 10 mL/kg 体重灌胃, 每日 2 次; 中药治疗组给予旋覆代赭汤浓缩药液 10 mL/kg 体重灌胃, 每日 2 次。

1.6 标本采集与检测: 各组大鼠均治疗 14 d, 于第 15 天处死, 处死前禁食 24 h、不禁水, 用 10% 水合氯醛 3 mL/kg 腹腔注射麻醉, 快速取出咽部以及食管组织进行检测。

1.7 观察指标及检测方法

1.7.1 一般状态: 每日观察并记录各组大鼠的体重、毛色、精神状态、进食以及活动情况。

1.7.2 组织形态及病理学变化观察: 在 4 °C 恒温箱进行操作, 利用冰生理盐水清洗咽部和食管组织, 肉眼观察大体形态。之后分别取咽部小块组织, 平均分为 3 份。取第 1 份标本固定, 常规制备病理切片, 行苏木素 - 伊红 (HE) 染色并在光镜下观察。

1.7.3 咽喉黏膜超微结构观察: 取第 2 份标本依次置于 3% 戊二醛固定液中固定 2 h、于 1% 锇酸溶液中固定 2 h, 梯度丙酮逐级脱水, Epon812 包埋, 用莱卡 (LEICA) 超薄切片行超薄切片, 醋酸双氧铀、柠檬酸铅双重染色后, 用日立 (H-7650) 透射电子显微镜观察咽喉黏膜上皮细胞、细胞间隙等结构改变。

1.7.4 咽喉黏膜紧密连接 claudin 蛋白表达水平测定: 取第 3 份标本, 石蜡包埋切片, 修复冷却清洗, 采用 10% 羊血清封闭, 用兔抗 claudin 抗体 (1:80)、羊抗 claudin 抗体 (1:100) 培养, 二氨基联苯胺显色液 (DAB) 避光显色, 10% 苏木素复染, 用乙醇逐渐脱水, 镜下观察黏膜层 claudin 蛋白表达。阳性表达以在细胞膜或胞质内出现棕褐色颗粒为判定标准, 在 200 倍视野下随机选择 5 个视野计数, 阳性表达率 < 5% 为 0 分, 5% ~ 25% 为 1 分, 26% ~ 50% 为 2 分, > 51% 为 3 分; 阳性表达强度 + 为 1 分, ++ 为 2 分, +++ 为 3 分, 阴性为 0 分。每张切片总分为阳性表达率得分与表达强度分数的总和。

1.8 统计学处理: 使用 SPSS 21.0 软件分析数据。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 SNK-*q* 检验; 计数资料以例表示。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况: 术后 1 周内共有 4 只大鼠死亡, 其中 LPRD 模型组 2 只、西药对照组 1 只、中药治疗组 1 只, 主要死亡原因为腹腔撕裂 (2 只) 和术后感染 (2 只), 死亡动物不记入统计。术后 1 周, LPRD 模型

大鼠均存在体质量增长缓慢、毛色暗淡无光, 伴有部分毛发脱落, 且精神不佳、行动迟缓、进食量和排泄量减少; 假手术组大鼠在体质量增长、毛色、精神、行动、进食及排泄量等方面均无明显变化; 经灌胃治疗后, 与 LPRD 模型组相比, 西药对照组和中药治疗组大鼠的体质量增长较明显, 毛色光亮程度有所恢复, 精神恢复, 进食量逐渐增多, 排泄量增多。

2.2 咽部及食管组织肉眼观察结果: 假手术组大鼠食管咽喉黏膜肉眼可见完整光滑, 无充血等现象。LPRD 模型组大鼠食管下段增粗, 中下段黏膜存在广泛病变, 可见点条状或片状充血和糜烂, 部分融合成片; 咽喉部黏膜部分糜烂, 大范围水肿、色红, 局部粗糙, 肉芽组织分布较多, 未见声门下喉室闭塞。西药对照组大部分食管黏膜较为光滑完整, 部分食管可见点条状充血、粗糙, 个别伴有片状糜烂, 未见溃疡及增生白斑; 咽喉部黏膜可见部分糜烂, 局部水肿、粗糙, 糜烂处可见少量肉芽组织, 未见声门下喉室闭塞。中药治疗组大鼠大部分食管黏膜较为光滑完整, 少数可见点条状充血发红, 个别可见小块糜烂, 未发现溃疡及增生白斑; 咽喉部黏膜未见糜烂, 局部水肿充血, 未见声门下喉室闭塞及肉芽组织。

2.3 咽喉黏膜紧密连接 claudin 蛋白表达 (表 1): 电镜观察显示, 假手术组大鼠咽部黏膜的上皮细胞侧面可见紧密连接, 且大部分细胞膜或胞质内出现棕褐色颗粒, 表达较强; LPRD 模型组表达最弱, 上皮细胞可见紧密连接蛋白表达弱, 极少部分细胞可见阳性表达; 西药对照组和中药治疗组 claudin 蛋白表达均强于 LPRD 模型组, 但弱于假手术组, 部分细胞可见蛋白表达。与假手术组相比, LPRD 模型组大鼠 claudin 蛋白表达评分明显降低 (P < 0.05); 西药对照组和中药治疗组 claudin 蛋白表达评分均较 LPRD 模型组明显升高 (P < 0.05), 且以中药治疗组升高最明显。

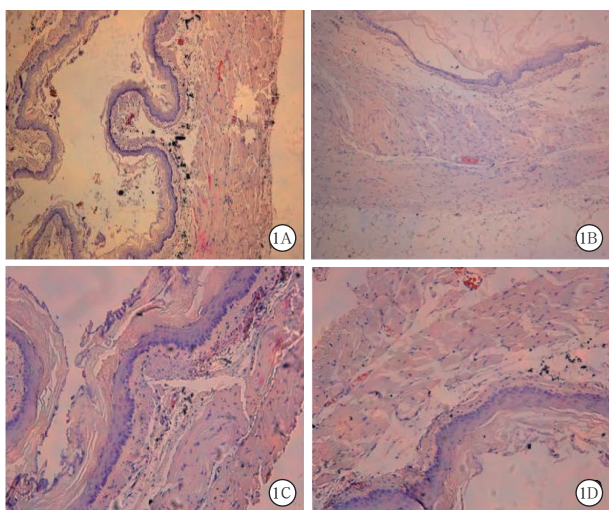
表 1 各组大鼠紧密连接 claudin 蛋白表达评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	claudin 蛋白表达评分 (分)
假手术组	20	3.35 ± 0.67
LPRD 模型组	18	1.33 ± 0.48 ^a
西药对照组	19	2.42 ± 0.51 ^{ab}
中药治疗组	19	2.74 ± 0.45 ^{abc}

注: LPRD 为胃食管反流性咽喉炎; 与假手术组比较, ^aP < 0.05; 与 LPRD 模型组比较, ^bP < 0.05; 与西药对照组比较, ^cP < 0.05

2.4 咽部黏膜光镜下病理改变 (图 1): LPRD 模型大鼠咽部黏膜上皮为假复层纤毛柱状上皮及复层鳞状上皮, 上皮层明显增生, 固有层可见炎性细胞浸

润,伴血管增多、扩张,纤维组织增生,以上特点符合咽部黏膜炎症表现,提示制模成功。假手术组光镜下可见咽部黏膜层表面为复层鳞状上皮或假复层纤毛柱状上皮,其固有层中有黏液性腺和混合性腺。西药对照组可见假复层纤毛柱状上皮及未角化复层鳞状上皮,上皮细胞增生,中度炎性细胞浸润,无血管增生及扩张,纤维组织增生,腺体结构正常。中药治疗组上皮层可见增生,炎性细胞浸润程度较LPRD模型组轻,轻度血管扩张,腺体结构正常,未见异常分泌和萎缩。



注:假手术组(1A)固有层炎性细胞浸润,伴血管增多、扩张,纤维组织增生,提示黏膜炎症;LPRD模型组(1B)固有层有黏液性腺和混合性腺,提示黏膜正常;西药对照组(1C)上皮细胞增生,伴中度炎性细胞浸润;中药治疗组(1D)上皮层可见增生,炎性细胞轻度浸润,伴轻度血管扩张;
LPRD为胃食管反流性咽喉炎

图1 光镜下观察各组大鼠咽部黏膜病理学改变
[苏木素-伊红(HE)染色 高倍放大]

3 讨论

LPRD的根本原因是由胃食管反流引起,反流液上行至咽喉部,刺激咽喉组织黏膜而引起的一系列症状和体征。有研究表明,与正常咽喉相比,反流患者咽喉黏膜的紧密连接发生形态学改变且claudin-1表达明显减少^[7]。上皮细胞的紧密连接是目前胃食管反流相关疾病的研究热点,紧密连接通过阻止细胞膜中脂质、蛋白质等的自由流动,完成栅栏功能;通过对透过物质的大小和所带电荷的选择性,调控水、离子和小分子溶质经旁细胞途径的转运,完成屏障功能^[4]。claudin家族分子是紧密连接蛋白的重要成员,所有的上皮和内皮组织都有表达,迄今已发现27个claudin家族成员^[4]。Xu等^[8]发现,与对照组相比,喉反流模型组大鼠食管和喉组织中claudin-3的表达均显著降低,故提出claudin-3

可能是大鼠反流性喉炎的敏感指标的结论。本研究成功制备LPRD大鼠模型,且LPRD模型组上皮细胞的claudin蛋白表达低于假手术组,说明胃食管反流液可损伤咽部黏膜细胞,损害上皮细胞紧密连接,降低claudin蛋白的表达;西药对照组和中药治疗组大鼠上皮细胞的病理损伤较LPRD模型组减轻,且claudin蛋白的表达阳性率和强度较LPRD模型组增强,说明旋覆代赭汤加味可有效改善咽部黏膜的病理损伤,并能提高claudin蛋白表达,稳定上皮细胞间的紧密连接。

旋覆代赭汤源自《伤寒论》,主治因胃气虚弱、痰浊内阻所致的胃气上逆,临床以心下痞硬、噎气不除、反胃呕吐、吐涎沫为主要临床表现^[9]。本研究应用旋覆代赭汤加射干、桔梗治疗LPRD,源于已有相关研究报道旋覆代赭汤治疗胃食管反流相关疾病的疗效较好^[10]。射干苦寒,归肺经,具有清热解毒、祛痰利咽的功效;桔梗苦辛平,也归肺经,具有开宣肺气、祛痰、排脓的功效。桔梗、射干相配,宣降肺气,复气机之紊乱,开喉利咽,与旋覆代赭汤合味以降气化痰和胃,寒热并用,升降有司。上方在此次研究中可有效改善LPRD大鼠胃食管反流情况,减轻咽喉组织炎症反应,改善上皮细胞增生,减少炎性细胞浸润,并有效保护紧密连接,增加claudin蛋白表达,可有效防御反流液损伤咽喉黏膜,值得临床进一步推广应用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李进让. 咽喉反流性疾病规范化诊断和治疗[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2015, 22(9): 435-437. DOI: 10.16066/j.1672-7002.2015.09.001.
- [2] Tauber S, Gross M, Issing WJ. Association of laryngopharyngeal symptoms with gastroesophageal reflux disease [J]. Laryngoscope, 2002, 112(5): 879-886. DOI: 10.1097/00005537-200205000-00019.
- [3] 曹利红, 杜昕, 杨丽静. 基于气机升降理论应用旋覆代赭汤加味治疗胃食管反流性咽喉炎的临床研究[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(11): 2347-2349. DOI: 10.13192/j.issn.1000-1719.2018.11.032.
- [4] 张运希, 张国妮, 唐伟. 旋覆代赭汤治疗胃食管反流性咽喉炎[J]. 中医学报, 2019, 34(2): 370-374. DOI: 10.16368/j.issn.1674-8999.2019.02.087.
- [5] 丛馨, 张艳, 俞光岩, 等. 上皮细胞间紧密连接功能的研究进展[J]. 生理学报, 2016, 68(4): 492-504. DOI: 10.13294/j.aps.2016.0057.
- [6] 赵海君, 钱易, 崔毓桂, 等. 紧密连接的结构与功能[J]. 国际生殖健康计划生育杂志, 2013, 32(5): 384-386.
- [7] 吴昆旻, 李泽卿, 朱春晖, 等. 紧密连接蛋白在声带白斑伴咽喉反流患者声带黏膜中的表达[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2017, 23(6): 541-545. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.201706009.
- [8] Xu XB, Hu Y, Wang Y, et al. Expression of claudin-3 in the esophagus and larynx of rat reflux model [J]. Auris Nasus Larynx, 2014, 41(6): 539-542. DOI: 10.1016/j.anl.2014.05.011.
- [9] 张仲景. 伤寒论[M]. 王叔和, 撰次. 钱超尘, 郝万山, 整理. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [10] 王均海. 旋覆代赭汤加减治疗胃食管反流症临床研究[J]. 中医学报, 2013, 28(11): 1719-1720.

(收稿日期: 2020-06-16)