

清郁和降汤抑制反流性食管炎大鼠5-HT释放及 TGR5/TRPA1通路蛋白表达

周易¹, 黄雨晴¹, 叶松²

(1. 湖北中医药大学, 湖北武汉 430065; 2. 湖北省中医院, 湖北武汉 430061)

摘要:【目的】探讨清郁和降汤对反流性食管炎(RE)大鼠的治疗作用及机制。【方法】将48只雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组、中药低、中、高剂量组及西药组, 每组8只。除假手术组, 其余5组大鼠采用前胃结扎联合外置幽门部分结扎术建立反流性食管炎模型。成功造模后, 中药低、中、高剂量组分别对应给予清郁和降汤7.9、15.8、31.6 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃, 西药组给予泮托拉唑蒸馏水混悬液8.4 mg·kg⁻¹·d⁻¹、莫沙比利蒸馏水混悬液0.19 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃, 假手术组与模型组给予等体积蒸馏水灌胃。连续灌胃14 d后, 将所有大鼠处死取材。采用苏木素-伊红(HE)染色法观察食管组织病理学改变, 采用酶联免疫吸附分析(ELISA)检测血清中5-羟色胺(5-HT)、色氨酸羟化酶1(TPH1)、P物质(SP)、降钙素基因相关肽(CGRP)的含量, 分别采用实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)法、蛋白免疫印迹(Western Blot)法对应检测食管组织G蛋白偶联受体5(TGR5)、瞬时受体电位锚蛋白1(TRPA1)、瞬时受体电位香草酸亚型1(TRPV1)、磷脂酶C(PLC)、蛋白酶激活受体2(PAR2) mRNA或蛋白表达水平。【结果】与假手术组比较, 模型组大鼠可见食管黏膜出现较为明显的损伤及炎细胞浸润, 血清中5-HT、TPH1、SP、CGRP含量显著增高($P<0.01$), 食管组织中TRG5、TRPA1、TRPV1、PLC、PAR2 mRNA及蛋白表达水平显著增高($P<0.01$); 与模型组比较, 中药低、中、高剂量组及西药组大鼠食管黏膜病理损伤得到明显改善, 血清中5-HT、TPH1、SP、CGRP含量显著降低($P<0.01$), 食管组织中TRG5、TRPA1、TRPV1、PLC、PAR2 mRNA及蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。【结论】清郁和降汤可有效改善大鼠反流性食管炎, 其机制可能与抑制TGR5/TRPA1通路, 减少5-HT释放, 进而降低食管敏感性有关。

关键词: 清郁和降汤; 反流性食管炎; 5-羟色胺(5-HT); TGR5/TRPA1通路; 大鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2023)12-3115-08

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2023.12.025

Qingyu Hejiang Decoction Inhibits the Release of 5-HT and the Expression of TGR5/TRPA1 Pathway Proteins in Rats with Reflux Esophagitis

ZHOU Yi¹, HUANG Yu-Qing¹, YE Song²

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065 Hubei, China; 2. Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061 Hubei, China)

Abstract: **Objective** To investigate the therapeutic effect and mechanism of Qingyu Hejiang Decoction on rats with reflux esophagitis (RE). **Methods** Forty-eight male SD rats were randomly divided into sham-operation group, model group, low-, medium- and high- dose groups of Chinese medicine and western medicine group, with 8 rats in each group. In addition to the sham-operation group, the remaining five groups of rats were used to establish a reflux esophagitis model by combining anterior gastric ligation with external pyloric partial ligation. After successful modeling, the low-, medium- and high- dose groups of Chinese medicine were given 7.9, 15.8, 31.6 g·kg⁻¹·d⁻¹ gavage respectively, the western medicine group was given 8.4 mg·kg⁻¹·d⁻¹ of Pantoprazole in distilled water suspension and 0.19 mg·kg⁻¹·d⁻¹ of Mosapride in distilled water suspension, and the sham-operation group and the model group were given equal volume of distilled water by gavage. After 14 days of

收稿日期: 2023-03-29

作者简介: 周易(1992-), 男, 在读博士研究生; E-mail: 673233185@qq.com。黄雨晴(1991-), 女, 主治医师; E-mail: 527002781@qq.com

通信作者: 叶松(1962-), 男, 主任医师, 博士研究生导师; E-mail: afk548@163.com

基金项目: 叶松全国名老中医专家传承工作室建设项目(国中医药人教函[2022]75号); 湖北省科技厅省自然科学基金创新发展联合基金项目(编号: 2022CFD141)

continuous gavage, all rats were killed and the materials were taken. The histopathological changes of the oesophagus were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and the serum levels of 5-hydroxytryptamine (5-HT), tryptophan hydroxylase 1 (TPH1), substance P (SP), and calcitonin gene-related peptide (CGRP) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and protein immunoblotting (Western Blot) methods were used to detect the mRNA or protein expression levels of G protein-coupled bile acid receptor 5 (TGR5), transient receptor potential anchoring protein 1 (TRPA1), transient receptor potential vanilloid isoform 1 (TRPV1), phospholipase C (PLC), and protease-activated receptor 2 (PAR2) in esophageal tissue, respectively. **Results** Compared with the sham-operation group, rats in the model group showed more obvious damage and inflammatory cell infiltration in the esophageal mucosa, with significantly higher serum levels of 5-HT, TPH1, SP and CGRP ($P < 0.01$), and significantly higher levels of mRNA and protein expressions of TRG5, TRPA1, TRPV1, PLC and PAR2 in the esophageal tissue ($P < 0.01$). In comparison with the model group, the pathological damage of esophageal mucosa of rats in the low-, medium- and high- dose groups of Chinese medicine and the western medicine group was significantly improved, the serum levels of 5-HT, TPH1, SP and CGRP were significantly reduced ($P < 0.01$), and the mRNA and protein expression levels of TRG5, TRPA1, TRPV1, PLC and PAR2 in the esophageal tissue were significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** *Qingyu Hejiang* Decoction can effectively improve RE in rats, and its mechanism may be related to the inhibition of TGR5/TRPA1 pathway, reducing 5-HT release, and then reducing esophageal sensitivity.

Keywords: *Qingyu Hejiang* Decoction; reflux esophagitis; 5-hydroxytryptamine (5-HT); TGR5/TRPA1 pathway; rats

反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)为临床常见的消化系统疾病,其症状表现复杂,典型症状包括反复发作的烧心和反酸,其他症状还包括胸痛、腹痛、吞咽困难、咳嗽、咽喉炎等^[1],且发病率仍在不断增高^[2]。本课题组前期研究已经证实,清郁和降汤治疗肝胃郁热型RE患者,有较好的疗效及安全性^[3-5];但其具体机制尚不明确。现阶段研究表明,RE的发病机制与抗反流防御功能的减弱、反流物对食管黏膜的攻击作用增强、胃排空延迟、内脏高敏感、遗传及精神心理因素等多种因素有关^[2],5-羟色胺(5-HT)分泌异常在RE的发病过程中扮演重要的角色。5-HT由肠道中肠嗜铬细胞(ECs)产生,能够与肠神经系统(ENS)上的多种受体结合,是胃肠反射的关键激活剂^[6-7],还是与抑郁、焦虑等情绪密切相关的激素之一^[8-10]。G蛋白偶联胆汁酸受体(TGR5)是ECs细胞中的受体之一,能够促使ECs细胞释放5-HT^[11]。瞬时受体电位锚蛋白1(TRPA1)和瞬时受体电位香草酸亚型1(TRPV1)作为人体细胞中介导内脏敏感性的物质,同样能够受到TGR5的影响,进而诱导

神经源性炎症,介导病理条件下的内脏感觉高敏感^[12],促进RE的发生。因此,本研究通过构建RE大鼠病理模型,观察清郁和降汤对RE大鼠TGR5/TRPA1通路及血清5-HT等的影响,进一步探讨清郁和降汤对RE的干预机制,以期为其临床治疗RE提供参考,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 48只SPF级雄性SD大鼠,体质量180~200 g,购自三峡大学实验动物中心,实验动物生产许可证号:SCXK(鄂)2022-0012。饲养于湖北中医药大学实验动物中心SPF级实验室,实验动物使用许可证号:SYXK(鄂)2023-0067。随机分笼,自由进食饮水,12 h光照、12 h黑暗交替。实验动物方案已获得湖北中医药大学动物伦理委员会审批,批号:HUCMS202204018。适应性喂养7 d后开始进行造模。

1.2 药物 清郁和降汤组成:柴胡10 g、枳壳10 g、厚朴10 g、炒莱菔子15 g、陈皮10 g、砂仁6 g、黄连6 g、吴茱萸3 g、佛手10 g、香橡皮10 g、

郁金 10 g、延胡索 10 g、川楝子 10 g、赤芍 10 g、白芍 10 g、海螵蛸 10 g。所有中药材由湖北省中医院中药房提供。应用自动煎药机进行煎煮、浓缩, 4℃冰箱中储存。成人用量为日1剂, 每日2次, 每次200 mL。泮托拉唑钠肠溶片, 由湖南九典制药股份有限公司生产, 批准文号: H20093501, 40 mg/片, 成人用量每日2次, 每次1片; 枸橼酸莫沙比利片, 由成都康弘药业集团股份有限公司生产, 批准文号: H19990313, 5 mg/片, 成人用量每日3次, 每次1片。动物灌胃剂量按成人体表面积换算。

1.3 试剂与仪器 PCR产物Universal DNA 纯化回收试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]; 建库试剂盒进行文库的构建: NEB Next® Ultra DNA Library Prep Kit(美国Illumina公司)。5-HT、色氨酸羟化酶1(TPH1)、P物质(SP)、降钙素基因相关肽(CGRP)等酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒(江苏酶免实业有限公司); TGR5抗体、TRPV1抗体、磷脂酶C(PLC)抗体(武汉三鹰生物科技有限公司); TRPA1抗体、蛋白酶激活受体2(PAR2)抗体(美国Affinity公司); 山羊抗小鼠/兔辣根过氧化物酶(HRP)标记IgG二抗(美国Jackson公司)。RM2016病理切片机(上海徕卡仪器有限公司); Eclipse E100正置光学显微镜、DS-U3成像系统(日本尼康公司); CR21G II高速冷冻离心机(日本日立公司); ABI 5700荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystems公司); FlexStation 3多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司); DY CZ-24DN垂直电泳槽、DY CZ-40电转仪(北京六一仪器厂); TS-1水平摇床(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司); CPA电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.4 分组、模型制备与给药 将48只大鼠随机分为假手术组, 模型组, 中药低、中、高剂量组及西药组, 每组8只。按照参考文献方法^[4], 采用前胃结扎结合外置幽门部分结扎术构建RE大鼠模型。操作步骤: 所有大鼠于术前24 h开始禁食, 自由饮水。除假手术组, 其余各组大鼠麻醉满意后进行备皮, 沿腹中线中段开口约2 cm, 进入腹腔, 寻找胃部组织并向下拉出, 充分游离胃部及幽门附近组织。先以3-0线绕过前胃并将前胃结扎, 然后以3-0线绕过幽门, 把直径为0.38 mm的

玻璃棒置于幽门上, 将幽门与玻璃棒一同进行结扎, 再将玻璃棒抽出, 最后将胃部放入原位后关腹。假手术组大鼠以同样方式进行麻醉、开腹, 将胃部组织提出暴露约5 min后, 放回原位, 关腹。造模后将所有大鼠给予常规消毒后放回动物房中, 术后第1天均禁食不禁水, 术后第2天均给予少量进食, 术后第3天恢复正常饮食。造模后2周, 所有大鼠均存活。

术后第15天开始灌胃。按成人体表面积换算成动物给药剂量。中药低、中、高剂量组分别对应给予清郁和降汤7.9、15.8、31.6 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃; 西药组给予泮托拉唑蒸馏水混悬液8.4 mg·kg⁻¹·d⁻¹、莫沙比利蒸馏水混悬液0.19 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃, 假手术组与模型组给予等体积蒸馏水灌胃。以上药物及蒸馏水均以10 mL/kg进行灌胃, 每日1次, 连续灌胃14 d。

1.5 取材 所有大鼠连续灌胃14 d后, 禁食不禁水24 h。所有大鼠麻醉满意后, 经腹主动脉采血, 离心取上清置于-80℃冰箱待检。取贲门处及向上2 cm食管组织, 将食管组织纵向分成2部分, 一部分置于4%多聚甲醛溶液中进行固定和保存, 用于病理切片制作, 另一部分用于Western Blot及PCR检测, 置于-80℃冰箱待检。

1.6 观察指标与方法

1.6.1 大鼠一般状态 每日观察并记录各组大鼠毛发色泽、体质量、进食量、饮水量、精神状态、活动等一般状态。

1.6.2 食管黏膜病理学观察 取食管组织, 制备常规病理切片, HE染色后, 显微镜下观察大鼠食管黏膜病理形态学表现。

1.6.3 ELISA法检测血清5-HT、TPH1、SP、CGRP含量 将大鼠血液于4℃、3 000 r/min(离心半径4 cm)离心20 min, 收集上清液, 按照5-HT、TPH1、SP、CGRP ELISA试剂盒说明书进行检测。

1.6.4 Western Blot法检测食管组织TRG5、TRPA1、TRPV1、PLC、PAR2的蛋白表达 取食管组织, 置于冰上裂解30 min, 离心, 收集上清。将蛋白样品放入沸水浴10 min进行变性, 然后电泳, 转膜(PVDF), 封闭。加入TRG5、TRPA1、TRPV1、PLC、PAR2等一抗(1:1 000稀释)4℃孵育过夜, 洗膜; 加入HRP标记IgG二抗(1:5 000稀释), 洗膜; 加入增强化学反应试剂, 待荧光带明显后,

进行显影和定影。最后应用 Image-pro Plus 软件分析胶片条带灰度,结果以目的蛋白条带灰度值与内参蛋白灰度值比值表示目的蛋白的相对表达量,内参为 GAPDH。

1.6.5 实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)法检测食管组织 TRG5、TRPA1、TRPV1、PLC、PAR2 的 mRNA 表达 取食管组织,提取总 RNA 后,在 42 ℃、30 min, 85 ℃、5 s 的条件下,用第一链 cDNA 合成试剂盒将提取的总 RNA 反转成 cDNA,在 95 ℃预变性 30 s, 1 个循环, 95 ℃变性 15 s, 60 ℃退火 30 s, 40 个循环的条件下,对 cDNA 进行 PCR 扩增。引物序列: TGR5 上游 5'-CCCTCATCG TCATCGCCAACC-3', 下游 5'-GGAAGAAGCAG CCAGCAGGTG-3', 片段长度 87 bp; TRPA1 上游 5'-ATCCAAATAGACCCAGGCACG-3', 下游 5'-CAAGCATGTGTCAATGTTTGGTACT-3', 片段长度 227 bp; TRPV1 上游 5'-GTGACGCTGATTGAA GAC-3', 下游 5'-CCGATGGTGAACCTTGAAC-3', 片段长度 168 bp; PLC 上游 5'-GCCGAGTATTGCC GATTA-3', 下游 5'-ACTTCCCTCTGACTACTT-3', 片段长度 235 bp; PAR2 上游 5'-CAGTGGCA CCATCCAAGGAA-3', 下游 5'-CAGTGGCACCAT CCAAGGAA-3', 片段长度 138 bp。引物由武汉赛维尔生物科技有限公司合成。最后采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目的基因的相对表达水平,内参为 GAPDH。

1.7 统计方法 采用 SPSS 26.0 统计学软件进行数据分析。若数据符合正态分布,多组比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法检验;若数据为非正态分布,则采用非参数秩和检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般状态比较 所有大鼠均存活。其中:假手术组大鼠毛发色泽光鲜、精神充沛、活动敏捷,食量较多;给予造模手术的大鼠出现不同程度的精神萎靡,活动减少,毛发色泽晦暗,进食饮水减少,体质量增加不明显等表现;开始药物灌胃后,中药低、中、高剂量组及西药组大鼠的症状均出现不同程度的改善。

2.2 各组大鼠食管病理学表现比较 图 1 结果显示:假手术组大鼠食管黏膜中未见明显炎症反应;模型组大鼠可见食管鳞状上皮增厚及少量基

底细胞增生,部分黏膜糜烂;中药低、中、高剂量组及西药组大鼠食管黏膜鳞状上皮增生及炎症细胞浸润均有所改善,未见明显糜烂或溃疡,其中,中药中剂量组对食管黏膜的恢复作用最佳,可见食管黏膜无鳞状上皮及基底细胞增生,未见糜烂和溃疡。

2.3 各组大鼠血清 5-HT、TPH1、SP、CGRP 含量比较 图 2 结果显示:与假手术组比较,模型组大鼠血清 5-HT、TPH1、SP、CGRP 含量均显著增高 ($P < 0.01$);与模型组比较,中药低、中、高剂量组及西药组大鼠血清 5-HT、TPH1、SP、CGRP 含量均显著降低 ($P < 0.01$);中药中剂量组大鼠血清 5-HT、TPH1、SP、CGRP 含量最接近假手术组。

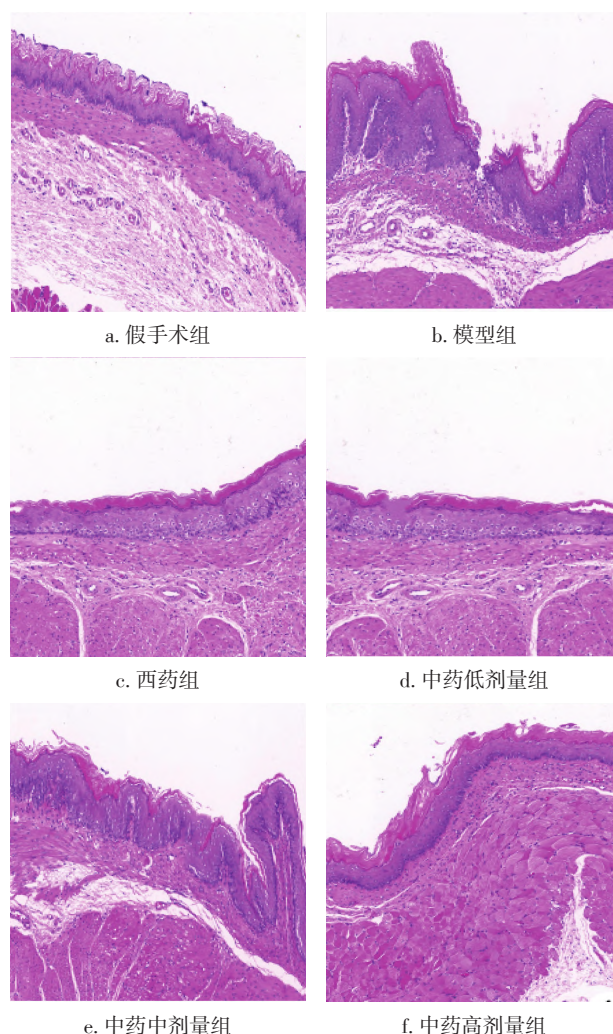
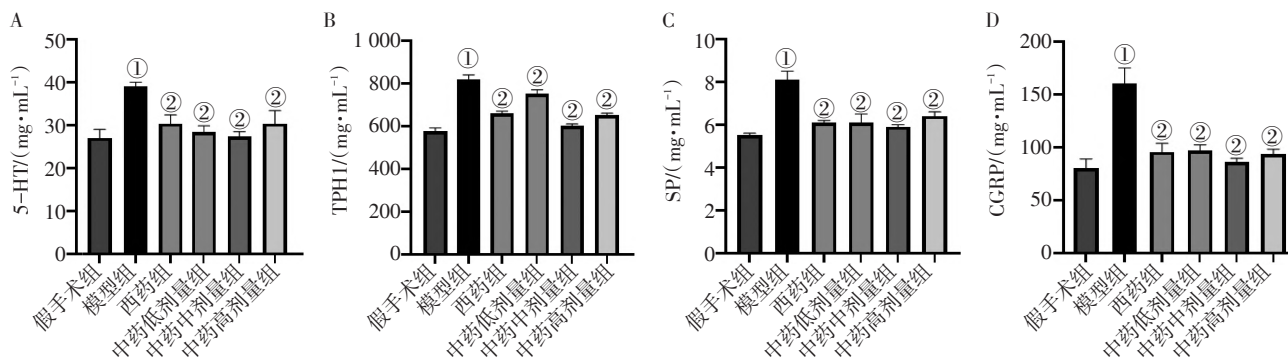


图 1 各组大鼠食管病理学表现比较(HE 染色法, ×100)

Figure 1 Comparison of pathological manifestations of the oesophagus among each group of rats (HE staining method, ×100)



注: A. 5-HT; B. TPH1; C. SP; D. CGRP. ① $P < 0.01$, 与假手术组比较; ② $P < 0.01$, 与模型组比较

图2 各组大鼠血清5-HT、TPH1、SP、CGRP含量比较

Figure 2 Comparison of serum 5-HT, TPH1, SP and CGRP levels among each group of rats

2.4 各组大鼠食管组织中TGR5、TRPA1、TRPV1、PLC、PAR2的蛋白表达比较 图3、表1结果显示: 与假手术组比较, 模型组大鼠食管组织TGR5、TRPA1、TRPV1、PLC、PAR2蛋白表达水平均显著增高($P < 0.01$); 与模型组比较, 中药低、中、高剂量组及西药组大鼠食管组织TGR5、TRPA1、TRPV1、PLC、PAR2蛋白表达水平均降低($P < 0.05$), 其中, 以中药中剂量组表达最低。

2.5 各组大鼠食管组织TGR5、TRPA1、TRPV1、PLC、PAR2的mRNA表达比较 表2结果显示: 与假手术组比较, 模型组大鼠食管组织TGR5、TRPA1、TRPV1、PLC、PAR2的mRNA表达水平显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 中药低、中、高剂量组及西药组大鼠食管组织TGR5、TRPA1、TRPV1、PLC、PAR2的mRNA表达水平降低($P < 0.05$); 中药中剂量组上述各指标的蛋白表达水平最接近假手术组。

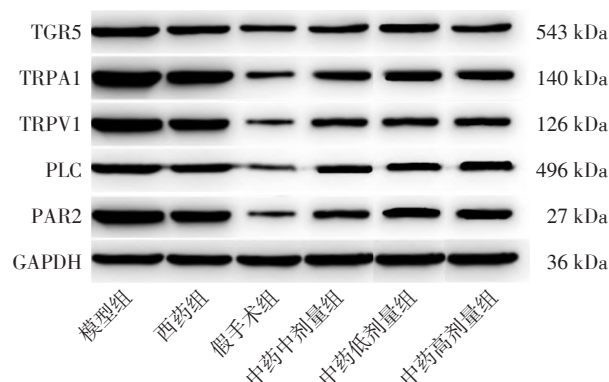


图3 各组大鼠食管组织中TGR5、TRPA1、TRPV1、PLC、PAR2的Western Blot电泳条带图

Figure 3 Western Blot electrophoretic strip plots of TGR5, TRPA1, TRPV1, PLC, PAR2

3 讨论

反流性食管炎(RE)归属于中医学“吐酸”“食管瘴”等范畴, 其基本病机为“胃失和降, 浊气上逆”, 以和胃降逆为治疗大法。RE的中医病机特

表1 各组大鼠食管组织TGR5、TRPA1、TRPV1、PLC、PAR2蛋白相对表达量比较

Table 1 Comparison of relative protein expressions of TGR5, TRPA1, TRPV1, PLC and PAR2 in oesophageal tissue among each group of rats

组别	鼠数/只	TGR5	TRPA1	TRPV1	PLC	PAR2
假手术组	8	0.09 ± 0.02	0.53 ± 0.05	0.38 ± 0.03	0.34 ± 0.02	0.64 ± 0.05
模型组	8	0.61 ± 0.05 ^①	0.89 ± 0.05 ^①	0.78 ± 0.05 ^①	0.64 ± 0.08 ^①	0.96 ± 0.06 ^①
西药组	8	0.23 ± 0.07 ^②	0.66 ± 0.06 ^②	0.49 ± 0.05 ^②	0.50 ± 0.04 ^②	0.80 ± 0.05 ^②
中药低剂量组	8	0.24 ± 0.05 ^②	0.69 ± 0.01 ^②	0.51 ± 0.09 ^②	0.52 ± 0.03 ^②	0.81 ± 0.07 ^②
中药中剂量组	8	0.18 ± 0.05 ^②	0.60 ± 0.01 ^②	0.41 ± 0.06 ^②	0.38 ± 0.05 ^②	0.69 ± 0.07 ^②
中药高剂量组	8	0.25 ± 0.02 ^②	0.67 ± 0.01 ^②	0.45 ± 0.04 ^②	0.55 ± 0.02 ^②	0.78 ± 0.02 ^②

注: ① $P < 0.01$, 与假手术组比较; ② $P < 0.05$, 与模型组比较

表2 各组大鼠食管组织TGR5、TRPA1、TRPV1、PLC、PAR2的mRNA相对表达量比较
Table 2 Comparison of relative mRNA expressions of TGR5, TRPA1, TRPV1, PLC and PAR2 in
oesophageal tissue among each group of rats

($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数/只	TGR5	TRPA1	TRPV1	PLC	PAR2
假手术组	8	10.48 ± 10.28	8.84 ± 0.64	7.84 ± 8.20	149.20 ± 38.03	48.12 ± 13.51
模型组	8	65.65 ± 37.21 ^①	57.80 ± 39.71 ^①	54.75 ± 15.94 ^①	286.01 ± 20.01 ^①	148.12 ± 35.19 ^①
西药组	8	29.84 ± 12.90 ^②	23.54 ± 17.36 ^②	29.84 ± 11.76 ^②	192.20 ± 19.75 ^②	82.30 ± 27.34 ^②
中药低剂量组	8	29.11 ± 14.49 ^②	21.31 ± 18.66 ^②	31.59 ± 20.14 ^②	163.66 ± 24.67 ^②	70.40 ± 30.96 ^②
中药中剂量组	8	18.55 ± 13.64 ^②	10.78 ± 7.09 ^②	19.24 ± 9.84 ^②	188.17 ± 20.24 ^②	65.26 ± 21.20 ^②
中药高剂量组	8	22.84 ± 18.45 ^②	18.45 ± 6.49 ^②	33.45 ± 17.68 ^②	198.54 ± 31.75 ^②	90.10 ± 21.54 ^②

注：① $P < 0.01$ ，与假手术组比较；② $P < 0.05$ ，与模型组比较

点有三，“一为逆，二为热，三为郁”，均与肝密切相关^[1]。肝属木，主疏泄，喜条达而恶抑郁，肝气郁滞，再乘脾土，导致肝胃、肝脾不和；气机郁滞日久，有余而化火，火邪生酸，肝胆邪热犯及脾胃，致脾气不升，胃气不降，肝不随脾升，胆不随胃降，最终出现胃气挟火热之邪而上冲；脾胃亏虚，无以运化水湿，进而导致痰浊内蕴，痰浊与郁滞的气机阻隔于胸膈，胃气不得降而终上逆，最终出现胃中内容物侵袭食管，造成黏膜损伤及反酸、烧心等症状。现代医学研究^[13-14]表明，内脏高敏感是包括RE在内的多种消化道系统疾病的主要发病原因。由内脏高敏感所形成的内脏超敏反应与情绪不佳、潜在心理异常等原因相关^[15-16]，该观点与中医观点中的“肝郁”表现出的情志活动异常有异曲同工之妙。而不良情绪与心理会导致机体对生理和有害刺激的感知增强，同时也对食管造成更多的反流^[16]，最终导致RE的发生。

在本研究中，清郁和降汤以和胃降逆为主、佐以清热疏肝为治疗大法。方中以柴胡疏肝解郁，条达肝气，鼓舞脾胃清阳上行，为君药。枳壳、厚朴调中焦之气机升降，以降为主，与柴胡相伍，一升一降，加强气机之调理；黄连与吴茱萸一清一温，辛开苦降，使肝气得疏，肝火得清，胃气得降；郁金既可助柴胡疏肝解郁，条达肝气，又可活血行气止痛；故以枳壳、厚朴、黄连、吴茱萸、郁金共为臣药。莱菔子消食降气除胀，陈皮理气健脾和中，砂仁醒脾和胃，三药合用，可健运中州，恢复中焦气机升降；佛手、香橼皮同归肝经、胃经，善疏肝解郁，理气调中；川楝子疏肝气、泻肝火，延胡索行气活血止痛，

两药相配，可使气行血畅，疼痛自止；白芍酸敛肝阴，养血柔肝止痛；赤芍善清肝泻火、泄血分郁热；海螵蛸制酸敛疮降逆，为治疗胃酸过多之佳品；共为佐药。如叶松教授所言：盖气行则气血痰火湿食等邪皆能消散矣^[17]。本课题组前期应用清郁和降汤治疗肝胃郁热型RE患者，获得良好的疗效^[3-4]。本研究结果表明，清郁和降汤可明显改善RE大鼠食管黏膜病理损伤。

5-HT是中枢神经系统(CNS)中的一种关键神经递质，在调节肠道动力和神经功能方面均发挥着十分重要的作用^[18]。研究^[19]表明，5-HT可激活结肠中含降钙素基因相关肽(CGRP)感觉神经元上的5-羟色胺4(5-HT₄)/5-HT_{1P}受体，启动结肠蠕动反射，同时亦可通过与5-羟色胺3(5-HT₃)受体结合，引发结肠节律性推进运动的产生和传播，推动粪便颗粒由近端结肠向肛门移动。5-HT除了能够在肠道中发挥作用之外，同样能够影响到大脑^[20]。5-HT以色氨酸(Trp)作为前体，在色氨酸羟化酶(TPH)的参与下生成；TPH能够控制5-HT的合成速率^[21]。TPH又包含TPH1和TPH2两种亚型，前者存在于ECs细胞内，后者主要在大脑中缝核中发现^[22]。作为脑-肠互动中重要的神经递质之一，5-HT的过度表达和堆积能够触发兴奋性毒性，损伤迷走神经调控功能，进而导致内脏高敏感状态^[23]。TGR5能够在ECs细胞中激活细胞膜上的磷脂酶C(PLC)，进而促进5-HT的分泌^[24]，与此同时，细胞中的蛋白酶激活受体2(PAR2)受到PLC活化的影响，激活蛋白激酶C，引起TRPV1磷酸化，激活TRPV1，提高TRPV1对内源性激动剂的敏感性^[25]。TRPA1也会被激活^[26]。二者均是瞬时受体电位(TRP)通道家族中的成员，该家族的蛋白与

疼痛相关通路表达密切相关^[27]。TRPV1磷酸化后,细胞外的钙离子内流,引发神经末梢去极化反应,释放CGRP和SP^[28],进而导致渗出及炎症反应,反应在机体上即为疼痛和烧心等症状^[29-30]。TRPV1和TRPA1的激活形成正向联动效应,加重炎症及疼痛^[31]。目前认为,RE与TRPV1密切相关,其作用机制可能与内脏高敏状态有关^[29],TRPA1是TRPV1的受体之一,且广泛分布于胃肠道中^[32],其所介导的通路同样能够引起内脏敏感性及感觉异常的情况^[33]。故推测,TGR5/TRPA1通路异常,影响5-HT分泌,进而导致内脏高敏情况的出现,最终发生RE。本研究结果显示,模型组大鼠血清中5-HT、TPH1、SP、CGRP含量显著增高,食管组织中TGR5、TRPA1、TRPV1、PLC、PAR2的mRNA及蛋白表达水平显著增高,与假手术组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);中药低、中、高剂量组及西药组各指标均得到明显改善。表明清郁和降汤可有效抑制食管TGR5/TRPA1通路,减少5-HT的释放,改善食管敏感性。

综上所述,本研究成功建立了RE大鼠模型,食管TGR5/TRPA1信号通路关键产物如TRPA1、TRPV1、5-HT表达均有所增高,呈内脏高敏状态,而应用清郁和降汤可显著降低RE大鼠血清中5-HT、TPH1、SP、CGRP的释放,同时降低大鼠食管TGR5、TRPA1、TRPV1、PLC、PAR2的蛋白及mRNA表达,进而纠正大鼠内脏高敏感,对RE起到良好的治疗作用。

参考文献:

- [1] 李军祥,陈詒,李岩. 胃食管反流病中西医结合诊疗共识意见(2017年)[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2018, 26(3): 221-226.
- [2] 中华医学会消化病学分会. 2020年中国胃食管反流病专家共识[J]. 中华消化杂志, 2020, 40(10): 649-663.
- [3] 罗樱. 清郁和降汤联合奥美拉唑治疗肝胃郁热型非糜烂性反流病的临床观察[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2017.
- [4] 黄雨晴,周易,黄鹤,等. 清郁和降汤对反流性食管炎模型大鼠食管组织LPS/TLR4/NF- κ B通路及食管黏膜屏障的影响[J]. 中医杂志, 2022, 63(22): 2170-2178.
- [5] 黄雨晴. 基于食管菌群探讨清郁和降汤对反流性食管炎的干预作用及机制[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2022.
- [6] MAWE G M, HOFFMAN J M. Serotonin signalling in the gut—functions, dysfunctions and therapeutic targets [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013, 10(8): 473-486.
- [7] 卢小芳,王悦芬,王彦刚. 5-HT通路异常与胃食管反流病[J]. 国际消化病杂志, 2014, 34(3): 163-166.
- [8] PEARSON K A, STEPHEN A, BECK S G, et al. Identifying genes in monoamine nuclei that may determine stress vulnerability and depressive behavior in Wistar-Kyoto rats [J]. Neuropsychopharmacology, 2006, 31(11): 2449-2461.
- [9] 汪忠镐,吴继敏,胡志伟,等. 中国胃食管反流病多学科诊疗共识[J]. 中华胃食管反流病电子杂志, 2020, 7(1): 1-28.
- [10] 谭庆晶,龙丽灯,陈卓,等. 解郁宁神汤联合草酸艾司西酞普兰对抑郁性神经症肝气郁结证患者血清DA、5-HT、NE及TNF- α 的影响[J]. 中医药导报, 2023, 29(1): 81-85.
- [11] SUN Q, JIA Q, SONG L, et al. Alterations in fecal short-chain fatty acids in patients with irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(7): e14513.
- [12] GOUIN O, L'HERONDELLE K, LEBONVALLET N, et al. TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization [J]. Protein Cell, 2017, 8(9): 644-661.
- [13] 杨晓,吴复苍,阚湘苓. 基于“内脏高敏感理论”辨治腹泻型肠易激综合征经验举隅[J]. 天津中医药大学学报, 2022, 41(6): 706-709.
- [14] 杨洁,任茜,郭庆红,等. 功能性胃肠病发病机制与治疗方法的研究进展[J]. 山东医药, 2019, 59(2): 87-90.
- [15] VAN WANROOIJ S J M, WOUTERS M M, VAN OUDENHOVE L, et al. Sensitivity testing in irritable bowel syndrome with rectal capsaicin stimulations: role of TRPV1 upregulation and sensitization in visceral hypersensitivity? [J]. Am J Gastroenterol, 2014, 109(1): 99-109.
- [16] KIM M, KIM T, HWANG W J, et al. Increased visceral sensitivity, elevated anxiety, and depression levels in patients with functional esophageal disorders and non-erosive reflux disease [J]. Neurogastroenterol Motil, 2021, 33(9): e14177-e14177.
- [17] 叶松. 魏喜保教授辨治胃病经验撷菁[J]. 中医药学刊, 2002, 20(3): 277-278.
- [18] DE VADDER F, GRASSET E, MANNERAS H L, et al. Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(25): 6458-6463.
- [19] 于爽,顾志敏,樊亚东,等. 胆汁酸免疫调节作用及其与肠道、肝脏炎症性疾病相关性的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(16): 2031-2036.
- [20] 汪铮,田培郡,朱然,等. 基于肠道类器官解析益生菌调节肠嗜铬细胞合成5-HT的效应物质[JOL]. 食品与发酵工业, 2023: 1-10[2023-07-23].
- [21] 李小兰,江敏,阮征,等. 色氨酸及其代谢产物5-HT对肠道功能的作用综述[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(7): 1997-2002.
- [22] MATTHES S, BADER M. Peripheral serotonin synthesis as a

- new drug target[J]. Trends Pharmacol Sci, 2018, 39(6): 560-572.
- [23] 唐吟茵, 许树长, 吴萍. 食物敏感与肠易激综合征研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(5): 35-39.
- [24] 陈振海, 冯江毅, 胡淞, 等. 枯草芽孢杆菌通过 TGR5/TRPA1 信号通路调节慢性传输型便秘小鼠的肠蠕动[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(7): 878-884.
- [25] CHANDRABALAN A, RAMACHANDRAN R. Molecular mechanisms regulating proteinase-activated receptors (PARs) [J]. FEBS J, 2021, 288(8): 2697-2726.
- [26] SORET R, CHEVALIER J, DE COPPET P, et al. Short-chain fatty acids regulate the enteric neurons and control gastrointestinal motility in rats [J]. Gastroenterology, 2010, 138(5): 1772-1782.
- [27] CELSI F, PERI F, CAVASIN J, et al. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) methylation and chronic pain: a systematic review[J]. Genes (Basel), 2023, 14(2): 411.
- [28] 黄坤, 李会, 宋倩倩. TRPV1 通道与炎症的研究[J]. 当代临床医刊, 2017, 30(6): 3605-3606.
- [29] 张庆奎, 刘若卓, 于生元. 瞬时受体通道 V1 生理特性研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2017, 23(10): 759-763.
- [30] 许智超, 年媛媛, 孟宪梅. TRPV1 在胃食管反流病患者发病中的作用机制[J]. 现代消化及介入诊疗, 2021, 26(6): 697-701.
- [31] FATTORI V, FRANKLIN N S, GONZALEZ-CANO R, et al. Nonsurgical mouse model of endometriosis-associated pain that responds to clinically active drugs [J]. Pain, 2020, 161(6): 1321-1331.
- [32] YANG M Q, YE L L, LIU X L, et al. Gingerol activates noxious cold ion channel TRPA1 in gastrointestinal tract [J]. Chin J Nat Med, 2016, 14(6): 434-440.
- [33] BALEMANS D, BOECKXSTAENS G E, TALAVERA K, et al. Transient receptor potential ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades underlying visceral hypersensitivity [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2017, 312(6): G635-G648.

【责任编辑：侯丽颖】

警示：钓鱼网站 <http://www.gzzyydxxb.cn/> 为假冒本刊网站

尊敬的作者、读者、专家：

现网上诈骗、虚假网站盛行，假冒本刊网站的钓鱼网站甚至冠以本刊官网实施诈骗，其中主要的诈骗网站有：(1) <http://www.gzzyydxxb.cn/>；(2) <http://gzzyydxxb.yixue.org.cn/>，其目的在于骗取作者的审稿费、版面费！请大家警惕！

本刊已采用在线投稿，不接受邮箱投稿。本刊与作者联系的邮件为系统发送邮件，编辑部邮箱以网上公布的为准。并请作者注意，本刊来稿不收审稿费，录用后收取一定版面费。涉及到收取版面费的账号户名只有“广州中医药大学”，其他一切要求个人账号汇款者均为诈骗账户，切莫上当受骗。

现网络鱼龙混杂，验证是否本刊真实网站的简单办法：

1. 本刊官方网站只有一个，从本刊正式发行的刊物版权页可识别。本刊“编辑部远程稿件处理系统”网址：<http://xb.zyxy.com.cn>。

2. 本刊由广州中医药大学主办，在大学网站 (www.gzucm.edu.cn) 主页有链接，点击 www.gzucm.edu.cn → 机构 → 教辅 → 期刊中心 → 《广州中医药大学学报》。

3. 虚假的网站都是做贼心虚！钓鱼网站不敢留真实的固定电话和编辑部联系方式。本刊固定电话：020-39354129，欢迎查询验证！

4. 最好的办法：订阅本刊杂志即可一目了然。

· 《广州中医药大学学报》编辑部 ·