

中图分类号

密级 公开

UDC

学号 1927012062



湖北中医药大学

Hubei University of Chinese Medicine

博士学位论文

DOCTORAL DISSERTATION

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

Study on the Efficacy and Mechanism of Qingyuhejiang Decoction in
Treating reflux esophagitis based on esophageal flora

研 究 生 姓 名：黄雨晴

指导教师姓名、职称：叶 松 教授

申 请 学 位：医学博士

学 科（专业）名 称：中医内科学

学 位 类 型：专业学位型

湖北中医药大学

二〇二二年五月二十日

目录

中文摘要	I
ABSTRACT	VI
缩写词表	XV
前 言	1
第一部分 理论研究	5
1 食管微生物群与食管疾病关系的研究	5
1.1 食管微生物群	5
1.2 食管微生物群与食管疾病	6
1.3 PPI 对食管微生物群的影响	10
1.4 结语	11
2 反流性食管炎的中医理论研究	11
2.1 中医病名及溯源	11
2.2 病因病机	12
2.3 辨证施治	15
2.4 结语	18
第二部分 临床研究	19
清郁和降汤治疗肝胃郁热型反流性食管炎的临床疗效观察 ..	19
1 病例来源	20
2 治疗方案	24
3 观察项目	25
4 疗效评定标准	25
5 统计学处理	26
6 研究结果	27
7 讨论	31
第三部分 实验研究	37

实验一 清郁和降汤对反流性食管炎模型大鼠食管菌群的影响	38
1 实验材料	38
2 实验方法	39
3. 实验结果	44
4 讨论	62
实验二 清郁和降汤对反流性食管炎模型大鼠 LPS/TLR4/NF- κ B 通路及食管黏膜屏障的影响	66
1 实验材料	66
2 实验方法	68
3 结果	75
4 讨论	79
结 语	83
参考文献	84
附录一 综 述	98
附录二 量表	117
附录三 博士期间文章发表与科研	120
致 谢	121

中文摘要

目的:

将中医辨证为肝胃郁热证的反流性食管炎患者作为临床研究对象,观察中药复方清郁和降汤治疗本病的有效性和安全性;建立反流性食管炎大鼠模型,采用 16S rRNA 测序技术研究反流性食管炎与食管菌群的关系,并观察清郁和降汤对反流性食管炎大鼠食管菌群及相关通路的影响,挖掘清郁和降汤的作用机制,旨在为本病的临床诊治提供新思路和新方法。

方法:

1. 理论探讨:回顾并总结了针对食管菌群和食管疾病之间关系的研究,阐明了食管菌群在食管疾病的发生和发展中的重要作用,为进一步研究食管菌群在食管疾病生理病理机制中的潜在作用、探索食管疾病发病相关的特定菌群及治疗食管疾病的新思路和新方法提供了理论依据。回顾并总结了中医古籍及现代学者对反流性食管炎病名、病因病机及治疗方法的认识,阐述了中医药治疗反流性食管炎的有效性,为进一步深入研究中医药治疗不同证型反流性食管炎的作用机制提供了理论依据。

2. 临床研究:纳入了 94 例肝胃郁热型 RE 患者,随机分为中药组、西药组和中西药联用组,中药组予以清郁和降汤,西药组予以雷贝拉唑钠肠溶胶囊+枸橼酸莫沙比利分散片,中西药联用组予以清郁和降汤+雷贝拉唑钠肠溶胶囊+枸橼酸莫沙比利分散片,疗程均为 8 周,停药 3 个月后进行随访。观察并比较这三组治疗前后 Gerd Q 量表评分、中医症状评分、中医症状综合疗效、胃镜有效率、焦虑评分和远期疗效,同时进行治疗前和治疗后的安全性评估。

3. 实验研究:在 60 只 SD 雄性大鼠中,随机选取 10 只为假手术组(J 组),另外 50 只采用“前胃结扎+外置幽门部分结扎术”建立反流性食管炎大鼠模型,将造模成功的 40 只大鼠随机分为模型组(M 组)、中药组(予清郁和降汤)(Z 组)、西药组(予雷贝拉唑+莫沙比利)(X 组)和

中西药联用组（予清郁和降汤+雷贝拉唑+莫沙比利）（ZX组），每组10只。术后第15天开始，假手术组及模型组予蒸馏水灌胃，其他组分别给与相应的药物灌胃，持续14天。采用16S rRNA测序技术对各组食管菌群进行检测，同时进行组间物种组成的分析、Alpha（ α ）多样性分析、Beta（ β ）多样性分析、物种差异和标志物种分析。同时，采用苏木精-伊红（HE）染色观察大鼠食管组织的病理学改变；酶联免疫吸附试验（ELISA）法检测大鼠血清中及食管组织中脂多糖（LPS）、白细胞介素（IL）-1 β 、IL-6、IL-8含量；实时荧光定量聚合酶链式反应（Real-time PCR）检测食管组织中Toll样受体4（TLR4）、核转录因子 κ B（NF- κ B）p65、Claudin-1（Cldn1）、Claudin-4（Cldn4）mRNA水平；蛋白免疫印迹法（Western blot）检测食管组织中TLR4、NF- κ B p65、Cldn1、Cldn4蛋白表达水平。

结果：

1. 本研究共完成病例90例，中药组、西药组和中西药联用组各30例。我们首先对患者的性别、年龄、病程及治疗前Gerd Q量表总积分、中医症状单项积分、中医症状总积分、SAS总积分、胃镜下RE分级在三组中的分布进行了对比分析，结果显示三组间均无明显差异（ $P>0.05$ ），具有可比性。在中医症状综合疗效及胃镜下炎症改善有效率方面，中药组、西药组、中西药联用组的中医症状综合有效率分别为93.33%、90.00%、96.67%，中西药联用组有效率最高，但三组间的差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）；三组胃镜下炎症改善有效率分别为86.67%、93.33%、96.67%，中西药联用组有效率最高，但三组间的差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。在改善Gerd Q量表积分、中医症状总积分方面，中西药联用组疗效显著优于与中药组和西药组（ $P<0.05$ ），中药组与西药组疗效相当，无显著差异（ $P>0.05$ ）。在改善中医主要症状方面，西药组、中西药联用组对烧心的疗效均优于中药组（ $P<0.05$ ），西药组和中西药联用组对烧心的疗效无显著差异（ $P>0.05$ ）；三组对反酸的疗效无显著差异（ $P>0.05$ ）。

在改善中医次要症状方面，三组对胸骨后疼痛、胃脘灼痛、脘腹胀满、嘈杂易饥的疗效无显著差异 ($P>0.05$)；中西药联用组对嗝气的疗效优于西药组 ($P<0.05$)；中药组和中西药联用组对心烦易怒、口干口苦、大便秘结的疗效均优于西药组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。在改善焦虑评分方面，中药组、中西药联用组疗效均优于西药组 ($P<0.05$)，中药组与中西药联用组疗效相当，无显著差异 ($P>0.05$)。在远期疗效方面，停药 3 个月后中药组和中西药联用组 Gerd Q 量表的积分与治疗后的积分比较无显著差异 ($P>0.05$)，而西药组较治疗后明显升高 ($P<0.05$)，中药组和中西药联用组远期疗效优于西药组。在治疗的 8 周及随访的 3 个月时间里，3 组患者均未出现不良反应。

2. 各组间食管菌群的 α 多样性指数无显著差异 ($P>0.05$)。 β 多样性分析中的 PCoA 分析显示，假手术组 (J 组) 和模型组 (M 组) 菌群分布聚集在不同区域，明显分开；西药组 (X 组)、中药组 (Z 组)、中西药联用组 (ZX 组) 食管菌群分布与假手术组 (J 组) 和模型组 (M 组) 都有重叠，但三个治疗组均与假手术组 (J 组) 的重叠范围更大，距离更靠近假手术组 (J 组)。经 Anosim 方法检验，结果显示，5 个组总体进行比较，组间菌群组成的差异有统计学意义 ($P<0.05$)；其中，假手术组 (J 组) 和模型组 (M 组) 之间菌群的组成具有显著差异 ($P<0.01$)；假手术组 (J 组) 和西药组 (X 组) 之间菌群的组成也具有显著差异 ($P<0.05$)；假手术组 (J 组) 和中药组 (Z 组)、中西药联用组 (ZX 组) 分别进行组间菌群组成的比较，均没有显著差异 ($P>0.05$)；西药组 (X 组)、中药组 (Z 组)、中西药联用组 (ZX 组) 分别与模型组 (M 组) 比较，组间菌群组成均存在显著差异 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；而中药组 (Z 组)、西药组 (X 组)、中西药联用组 (ZX 组) 间两两比较菌群组成的差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

物种组成方面，在门水平，各组鉴定到的主要门类有厚壁菌门、变形菌门、放线菌门、拟杆菌门、OD1 和 TM7 等。厚壁菌门在各组中的相对丰

度排列依次为西药组（X组）、中西药联用组（ZX组）、中药组（Z组）、假手术组（J组）、模型组（M组）（90.05%、83.14%、82.50%、74.60%、53.35%）；变形菌门在各组中的相对丰度排列依次为模型组（M组）、假手术组（J组）、中药组（Z组）、中西药联用组（ZX组）、西药组（X组）（19.51%、10.99%、5.16%、3.55%、1.00%）；放线菌门在各组中的相对丰度排列依次为模型组（M组）、西药组（X组）、中药组（Z组）、中西药联用组（ZX组）、假手术组（J组）（9.70%、4.55%、2.95%、2.01%、1.24%）。拟杆菌门在各组中的相对丰度排列依次为模型组（M组）、西药组（X组）、中西药联用组（ZX组）、假手术组（J组）、中药组（Z组）（3.00%、1.54%、1.26%、0.43%、0.31%）。在假手术组（J组）中，厚壁菌门相对丰度最高，而模型组（M组）厚壁菌门相对丰度较假手术组（J组）降低，经药物干预后，三个治疗组厚壁菌门相对丰度较模型组（M组）增加；模型组（M组）中变形菌门、放线菌门、拟杆菌门相对丰度较假手术组增加，经药物干预后，三个治疗组变形菌门、放线菌门和拟杆菌门相对丰度较模型组（M组）降低。在属水平，各组鉴定到的主要菌属有乳杆菌属、链球菌属、Aggregatibacter、双歧杆菌属、阿洛巴氏菌属、梭菌属等。乳杆菌属在各组中的相对丰度排列依次为中药组（Z组）、中西药联用组（ZX组）、西药组（X组）、假手术组（J组）、模型组（M组）（70.20%、63.43%、63.33%、49.80%、18.34%）；链球菌属在各组中的相对丰度排列依次为假手术组（J组）、西药组（X组）、中西药联用组（ZX组）、模型组（M组）、中药组（Z组）（21.08%、15.11%、13.25%、6.86%、4.58%）。在假手术组（J组）中乳杆菌属相对丰度最高，而模型组（M组）乳杆菌属相对丰度较假手术组（J组）明显降低，经药物干预后，三个治疗组乳杆菌属相对丰度较模型组（M组）均增加；链球菌属在假手术组（J组）中也占优势，而模型组（M组）链球菌属相对丰度较假手术组（J组）降低，经药物干预后，西药组（X组）、中西药联用组（ZX组）链球菌属相对丰度较模型组（M组）增加。

经 LEfSe 分析, 发现与另外四组相比, 模型组 (M 组) 中共有的标志物种 (biomarker) 在属水平为苍白杆菌属、脱硫弧菌属、阿洛巴氏菌属等, 而假手术组 (J 组)、中药组 (Z 组)、西药组 (X 组) 和中西药组 (ZX 组) 的标志物种均为乳杆菌属。

3. 与假手术组比较, 模型组大鼠食管黏膜损伤最严重, 肉眼及镜下观察可见糜烂或溃疡, 镜下可见大量炎性细胞浸润。与模型组相比, 中药组、西药组、中西药联用组大鼠食管黏膜未见糜烂、溃疡, 损伤明显减轻。与假手术组比较, 模型组大鼠血清及食管组织中 LPS、IL-1 β 、IL-6、IL-8 表达明显增高 ($P<0.01$), 食管组织中 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 和蛋白表达明显增高 ($P<0.01$), 食管组织中 Clcn1、Clcn4 mRNA 和蛋白表达明显降低 ($P<0.01$); 与模型组相比, 3 个治疗组大鼠血清及食管组织中 LPS、IL-1 β 、IL-6、IL-8 表达明显降低 ($P<0.01$), 食管组织中 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 和蛋白表达明显降低 ($P<0.01$, $P<0.05$), 食管组织中 Clcn1、Clcn4 mRNA 和蛋白表达明显增高 ($P<0.01$, $P<0.05$)。

结论:

1. 清郁和降汤能有效治疗肝胃郁热型反流性食管炎, 能协同西药提高临床疗效, 并具有较好的远期疗效及安全性。

2. 反流性食管炎大鼠食管菌群发生了改变: 主要趋势是革兰氏阳性菌减少和革兰氏阴性菌增多, 在属水平的标志物种为苍白杆菌属、脱硫弧菌属、阿洛巴氏菌属等。清郁和降汤能调节食管菌群: 清郁和降汤干预后的食管菌群革兰氏阳性菌增多, 革兰氏阴性菌减少, 在属水平的标志物种为乳杆菌属。

3. 清郁和降汤可抑制 LPS/TLR4/NF- κ B 信号通路活化, 减轻食管炎症反应, 增强食管黏膜屏障功能, 促进食管黏膜修复, 有效改善食管黏膜损伤。

关键词: 清郁和降汤; 食管菌群; LPS; TLR4/NF- κ B

Study on the Efficacy and Mechanism of Qingyuhejiaing Decoction in Treating reflux esophagitis based on esophageal flora

Speciality: Internal medicine of Traditional Chinese Medicine

Author : Yuqing Huang

Supervisor : Song Ye

ABSTRACT

Objective:

This article firstly takes patients with reflux esophagitis of Stagnation-heat in Liver and Stomach as the research object to discuss the clinical efficacy and safety of Qingyuhejiang decoction ; Then the rat model of reflux esophagitis was established. 16SrRNA sequencing technique was used to study the relationship between reflux esophagitis and esophageal flora, and to observe the effect of Qingyuhejiangtang on esophagitis flora and related pathways in rats with reflux esophagitis, and to explore the mechanism of Qingyuhejiangtang, in order to provide new ideas and methods for clinical diagnosis and treatment of this disease.

Methods:

1.Theoretical discussion: This part reviews and summarizes the studies on the relationship between esophageal microflora and esophageal diseases, and expounds the important role of esophageal microflora in the occurrence and development of esophageal diseases. It provides a theoretical basis for further studying of the potential role of esophageal microflora in the physiological and

pathological mechanism of esophageal diseases, exploring specific flora related to the pathogenesis of esophageal diseases and new ideas and methods for the treatment of esophageal diseases. This part systematically reviews and summarizes the ancient books of traditional Chinese medicine and modern scholars' understanding of the disease name, etiology, pathogenesis and treatment of reflux esophagitis, and expounds the effectiveness of traditional Chinese medicine in the treatment of reflux esophagitis. It provides a theoretical basis for further study on the mechanism of traditional Chinese medicine in the treatment of different syndrome types of reflux esophagitis.

2. Clinical study: 94 patients with RE of Stagnation-heat in Liver and Stomach were randomly divided into western medicine group, traditional Chinese medicine group and combination group. The traditional Chinese medicine group was treated with Qingyuhejiang decoction, the western medicine group was treated with rabeprazole sodium enteric-coated capsule + mosapride citrate dispersible tablets, and the combination group was treated with Qingyuhejiang decoction + Rabeprazole sodium enteric-coated capsule + mosapride citrate dispersible tablets for 8 weeks, follow-up was performed 3 months after withdrawal. GerdQ scale score, TCM symptom score, comprehensive efficacy of TCM symptoms, effective rate of gastroscopy, anxiety score and long-term effect of the three groups before and after treatment were observed and compared, and the safety was evaluated before and after treatment.

3. Experimental study: among 60 SD male rats, 10 were randomly selected as sham operation group (group J), and the other 50 were

used "anterior gastric ligation combined with external pyloric partial ligation" to establish the rat model of reflux esophagitis. Forty successful rat models were randomly divided into model group (group M), traditional Chinese medicine group (treated with Qingyuhejiang decoction) (group Z), western medicine group (treated with rabeprazole sodium enteric-coated capsule + mosapride citrate dispersible tablets) (group X) and combination group (treated with Qingyuhejiang decoction + rabeprazole sodium enteric-coated capsule + mosapride citrate dispersible tablets) (group ZX), there were 10 rats in each group. From the 15th day after operation, the rats in the sham operation group (group J) and western medicine group (group X) were perfused with distilled water, and the other groups were given corresponding drugs for 14 days. 16S rRNA sequencing technique was used to detect the esophageal flora of each group, and species composition analysis, Alpha (α) diversity analysis, Beta (β) diversity analysis, species difference and marker species analysis were carried out at the same time. At the same time, the pathological changes of rat esophagus were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and the contents of lipopolysaccharide (LPS), interleukin (IL)-1 β , interleukin (IL)-6 and interleukin (IL)-8 in serum and esophageal tissue were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA levels of Toll-like receptor 4 (TLR4), nuclear factor kappa B (NF- κ B) p65, Claudin-1 (Cldn1) and Claudin-4 (Cldn4) in esophageal tissues were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and the protein expressions of TLR4, NF- κ B p65, Cldn1 and Cldn4 in esophageal tissues were detected by

Western blotting (Western blot).

Results:

1. A total of 90 cases were completed in this study, including Chinese medicine group ($n = 30$), western medicine group ($n = 30$) and combination group ($n = 30$). First of all, we compared and analyzed the sex, age, course of disease, score of Gerd Q scale, single score of TCM symptoms, total score of TCM symptoms, total score of SAS and endoscopic grading of RE before treatment among the three groups. The results showed that there was no significant difference in these factors among the three groups ($P > 0.05$). Then the comprehensive efficacy of TCM symptoms and gastroscopic efficacy of the three groups were observed. The comprehensive effective rates of TCM symptoms in traditional Chinese medicine group, western medicine group and combination group were 93.33%, 90.00% and 96.67% respectively, and there was no significant difference between the groups ($P > 0.05$). The effective rates under gastroscopy were 86.67%, 93.33% and 96.67%, respectively. But there was no significant difference among the three groups ($P > 0.05$). In terms of reducing the score of GerdQ scale and the total score of TCM symptoms, the curative effect of the combination group was better than the traditional Chinese medicine group and the western medicine group ($P < 0.05$). The curative effect of the traditional Chinese medicine group is similar to that of the western medicine group ($P > 0.05$). In the treatment of main symptoms of TCM, the curative effect of western medicine group and combination group on heartburn was better than that of traditional Chinese medicine group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the

efficacy of western medicine group and combination group on heartburn($P>0.05$). There was no significant difference in the effect of acid regurgitation among the three groups($P>0.05$). In the treatment of secondary symptoms of TCM, there was no significant difference in the curative effect of retrosternal pain, epigastric burning pain, abdominal distension and noisy hunger among the three groups ($P>0.05$). The curative effect of belching in the combination group was better than that in the western medicine group ($P<0.05$). The curative effect of traditional Chinese medicine group and combination group on irritability, dry mouth and bitter mouth and constipation was better than that of western medicine group ($P<0.05$ or $P<0.01$). In terms of reducing the anxiety score, the curative effect of traditional Chinese medicine group and combination group was better than western medicine group ($P<0.05$), but there was no significant difference between traditional Chinese medicine group and combination group($P>0.05$). In the long-term effect, there was no significant difference in the score of GerdQ scale between the traditional Chinese medicine group and the combination group 3 months after treatment($P>0.05$), but it was significantly higher in the western medicine group than after treatment ($P<0.05$), and the long-term effect of the traditional Chinese medicine group and combination group was better than western medicine group. During the 8 weeks of treatment and 3 months of follow-up, there were no adverse reactions in the three groups.

2. There was no significant difference in the α diversity index of the esophageal flora in each group ($P>0.05$). The PCoA analysis in β -diversity analysis showed that the distribution of bacterial

flora in the J group and the M group were clustered in different regions and were clearly separated; There was overlap, but all three treatment groups overlapped more with the J group and were closer to the J group. The Anosim test showed that there were significant differences in the composition of the overall comparative flora among the five groups ($P < 0.05$); among them, there was a significant difference in the composition of the flora between the J group and M group ($P < 0.01$); comparing the J group with the X group, there was a significant difference in the composition of the flora between them ($P < 0.05$); comparing the J group with the Z group and ZX group, there was no significant difference between them ($P > 0.05$); comparing the M group with the X group, Z group and ZX group, there were significant differences in the composition of microflora between them ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); while there was no significant difference among the Z group, X group and the ZX group ($P > 0.05$).

In terms of species composition, at the phylum level, the main taxa identified in each group were Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, OD1, TM7 and so on. The relative abundance of Firmicutes in each group was in the following order: X group, ZX group, Z group, J group and M group (90.05%, 83.14%, 82.5%, 74.60%, 53.35%). The relative abundance of Proteobacteria in each group was in the following order: M group, J group, Z group, ZX group and X group (19.51%, 10.99%, 5.16%, 3.55%, 1.00%). The relative abundance of Actinobacteria in each group was in the following order: M group, X group, Z medicine group, ZX group, J group (9.70%, 4.55%, 2.95%, 2.01%, 1.24%). The relative abundance of Bacteroidetes in each group was in the following order: M group,

X group, ZX group, J group, Z group (3.00%, 1.54%, 1.26%, 0.43%, 0.31%). In the J group, the relative abundance of Firmicutes was the highest, while the relative abundance of Firmicutes in the M group was significantly lower than that in the J group. the relative abundance of Firmicutes in the three treatment groups was significantly higher than that in the M group. The relative abundance of Proteobacteria, Actinobacteria and Bacteroidetes in the M group was significantly higher than that in the J group. After drug intervention, the relative abundance of Proteobacteria, Actinobacteria and Bacteroidetes in the three treatment groups was significantly lower than that in the M group.

At the genus level, the main bacteria identified in each group were Lactobacillus, Streptococcus, Aggregatibacter, Bifidobacterium, Allobaculum, Clostridium and so on. The relative abundance of Lactobacillus in each group was in the following order: Z group, ZX group, X group, J group, M group (70.20%, 63.43%, 63.33%, 49.80%, 18.34%). The relative abundance of Streptococcus in each group was in the following order: J group, X group, ZX group, M group, Z group (21.08%, 15.11%, 13.25%, 6.86%, 4.58%). The relative abundance of Lactobacillus in the J group was the highest, but the relative abundance of Lactobacillus in the M group was lower. after drug intervention, the relative abundance of Lactobacillus in the three treatment groups was higher than that in the M group. Streptococcus was also dominant in the J group, but the relative abundance of Streptococcus in the M group was lower than that in the J group. After drug intervention, the relative abundance of Streptococcus in the X group and ZX group was higher than that in

the M group.

By LEfSe analysis, it was found that the marker species (biomarker) in the M group were *Ochrobactrum*, *Allobaculum*, *Desulfovibrio*, etc., while the marker species in the J group, Z group, X group and ZX group were all *Lactobacillus*.

3. Compared with the J group, the esophageal mucosal injury in the M group was the most serious, erosion or ulcer could be seen under naked eye and microscope, and a large number of inflammatory cells could be seen under microscope. Compared with the M group, there was no erosion and ulcer in the esophageal mucosa of rats in the Z group, X group and ZX group. Compared with the J group, the expression of LPS, IL-1 β , IL-6 and IL-8 in serum and esophageal tissue of the M group was significantly increased ($P < 0.01$). The expression of TLR4 and NF- κ Bp65 mRNA and protein in esophageal tissue was significantly increased ($P < 0.01$), while the expression of Cldn1, Cldn4 mRNA and protein in esophageal tissue was significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the M group, the expression of LPS, IL-1 β , IL-6 and IL-8 in serum and esophageal tissue in the three treatment groups decreased significantly ($P < 0.01$), the expression of TLR4 and NF- κ Bp65 mRNA and protein in esophageal tissue decreased significantly ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and the expression of Cldn1, Cldn4 mRNA and protein in esophageal tissue increased significantly ($P < 0.01$, $P < 0.05$).

Conclusions:

1. Qingyuhejiang decoction can effectively treat reflux esophagitis with stagnant heat of liver and stomach, and cooperate with western medicine to improve the clinical efficacy, at the same

time, it has better long-term efficacy and safety.

2. The esophageal flora of rats with reflux esophagitis has changed: the main trend is the decrease of gram-positive bacteria and the increase of gram-negative bacteria, the marker species of esophageal flora in rats with reflux esophagitis were *Ochrobactrum*, *Allobaculum* and *Desulfovibrio* at the genus level. Qingyuhejiang decoction can regulate esophageal flora: after the intervention of Qingyuhejiang decoction, the number of Gram-positive bacteria increased and the number of Gram-negative bacteria decreased, and the marker species at the genus level was *Lactobacillus*.

3. Qingyuhejiang decoction can inhibit LPS/TLR4/NF- κ B signal pathway, reduce esophageal inflammation, enhance the function of esophageal mucosal barrier, promote esophageal mucosal repair, and effectively improve esophageal mucosal injury.

Key words Qingyuhejiang decoction; esophageal flora; LPS; TLR4/NF- κ B

缩写词表

缩写	英文名称	中文名称
GERD	gastroesophageal reflux disease	胃食管反流病
NERD	non-erosive reflux diseases	非糜烂性反流病
RE	reflux esophagitis	反流性食管炎
BE	Barrett' s esophagitis	Barrett 食管
PPI	proton pump inhibitor	质子泵抑制剂
LPS	lipopolysaccharide	脂多糖
TLR4	toll-likereceptors 4	Toll 样受体 4
NF- κ B	Nuclear factor-kappaB	核转录因子 κ B
EAC	esophageal adenocarcinoma	食管腺癌
ESCC	esophageal squamous cell cancer	食管鳞状细胞癌
EoE	eosinophilic esophagitis	嗜酸性粒细胞性食管炎
iNOS	inducible nitric oxide synthase	诱导型一氧化氮合酶
PCoA	Principal coordinate analysis	主坐标分析
LDA	Linear discriminant analysis	线性判别分析

前 言

胃食管反流病 (gastroesophageal reflux disease, GERD) 是一种胃或十二指肠内容物反流至食管、口腔或者喉部、肺等部位而引发相关症状和并发症的常见消化系统疾病^[1]。GERD 影响了约 8%-30% 的西方人口和 10% 的亚洲人口^[2-4]。胃食管反流病可分为三种类型, 非糜烂性反流病 (non-erosive reflux diseases, NERD)、反流性食管炎 (reflux esophagitis, RE) 和 Barrett 食管 (Barrett's esophagitis, BE)。RE 与 NERD 的主要区别在于 RE 内镜下可见食管黏膜破损, BE 是指食管下段的复层鳞状上皮被单层柱状上皮取代。RE 以烧心和反流为典型症状, 也可出现胸痛、嗝气、上腹痛、腹胀等不典型症状和吞咽困难、咽部异物感、慢性咳嗽、咽喉炎、哮喘等食管外综合征^[5]。其临床症状多样, 且复发率高, 常常需要反复就诊并进行长期或间断药物维持治疗, 严重影响民众健康和生活质量, 并带来了沉重的社会经济负担, 已引起国内外医学界的广泛关注和重视。

RE 的病因及发病机制尚未完全阐明, 目前认为涉及物理、化学、精神和神经等多方面的因素, 包括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、食管高敏感、遗传因素及精神心理因素等, 免疫因素介导所致的食管黏膜损伤及食管功能的改变也与 RE 发病有关^[6]。RE 的治疗主要以缓解反酸烧心等症状、减轻食管炎症、修复食管黏膜、防止病情复发和并发症的出现为目标, 治疗的手段包括一般治疗、药物治疗、抗反流手术及内镜下治疗等。药物治疗方面, 质子泵抑制剂 (proton pump inhibitor, PPI) 被认为是治疗 RE 最有效的药物, 总体上没有其他药物的疗效可以取代 PPI。然而, 有研究指出, 高达 40% 接受 PPI 治疗的患者仍有反流症状^[7], 长期 (6 个月) PPI 维持治疗后, 仍有 19% 的患者食管黏膜无法完全愈合^[8]。并且近年来有大量报道指出, 长期使用 PPI 治疗可出现营养缺乏、胃肠炎风险增加、艰难梭菌结肠炎、骨质疏松

和骨折、缺血性心脏病等各种副作用^[9]。针对 RE 的抗反流手术治疗方法也较多,但外科手术治疗有创伤性较大、费用高、长期疗效不确定等原因,病人依从性差,目前临床仍未能推广应用。内镜下治疗是一种新的治疗手段,具有与外科手术相比创伤面小、副作用相对少、恢复较快等优势,但其长期疗效还需要进一步研究证实,仍然无法取代药物治疗的地位。因此,探索针对 RE 疗效好、副作用少且复发率低的药物治疗方法,对 RE 患者具有重要意义。

近年来微生态相关研究呈指数级增长,无疑是目前医学界研究与关注的热点。机体和微生物共同组成一个“超级生物体”,它们相互依存、相互制约,在人体中所发挥的作用也日渐清晰^[10, 11]。随着专家学者们对消化道微生物组学的不断深入挖掘和研究,已经有越来越多的证据可以证实,正常的消化道微生态在维持人体的健康方面有着至关重要的作用,而消化道微生态的紊乱则与人体多种疾病的发生和发展有着紧密联系,同时消化道微生态还会影响疾病的治疗^[12]。相较于已经得到广泛认知的肠道微生态,对食管微生态的研究较少,是消化道微生态研究中一个新兴的研究领域。目前的研究发现食管具有多样化的常驻菌群,而食管疾病病程中常伴有食管菌群结构的改变^[13]。针对 RE 的诸多研究指出,RE 食管菌群出现了革兰氏阳性菌丰度减少和革兰氏阴性菌丰度增加这一特征性改变^[14, 15]。而革兰氏阴性菌丰度的增加及相关功能的改变与 RE 向 BE 至食管腺癌级联转变的早期过程也有着紧密联系^[16]。

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性菌外膜的主要结构,也是 Toll 样受体 4(toll-likereceptors 4, TLR4)的主要配体之一。TLR4 可识别 LPS 并启动活化信号,激活 NF- κ B 途径,诱导 IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10 及 TNF- α 等炎症因子过度表达,趋化大量的中性粒细胞等炎症细胞浸润,引起强烈的炎症反应;同时还能介导食管上皮细胞间的紧密连接蛋白表达和分布失调,使食管黏膜的屏障功能遭到破坏,进一步导致食管黏膜的损伤^[17]。而炎症反应可能又通过某些目前仍未完全了解

的机制反过来改变食管的微生态,例如炎症反应会导致硝酸盐的增加,而硝酸盐可能会促进兼性厌氧菌的生长,从而导致了菌群失调—炎症反应—菌群失调这一恶性循环^[18]。综上所述,食管菌群的改变在 RE 发病机制中的作用可能为:食管菌群从革兰氏阳性菌为主向革兰氏阴性菌转变,革兰氏阴性菌增多,激活 LPS/TLR4/NF- κ B 信号通路,诱导炎症细胞因子过度表达,介导炎症反应,破坏食管黏膜屏障功能,最终导致食管黏膜损伤。因此,革兰氏阴性菌可作为反流性食管炎的一个标志物和一个重要的干预靶点。通过药物使食管菌群中革兰氏阴性菌丰度降低,减少革兰氏阴性菌 LPS/TLR4/NF- κ B 通路的不利影响,减轻食管黏膜损伤,可以为治疗 RE 提供新思路和新方法。

中医药在治疗上具有多成分、多靶点、个体化及整体调节的优势,与西药相比优势凸显,可显著改善症状、降低复发率,且不良反应少^[19]。RE 归属于中医学“吐酸”、“食管瘁”等范畴。基本病机为胃失和降,浊气上逆。现代社会生活节奏快,精神压力大,临床多见肝胃郁热之象,治疗应以“疏肝清热、和胃降逆”为大法。针对肝胃郁热型 RE,导师叶松教授经多年临床实践总结出经验方“清郁和降汤”,该方以柴胡疏肝散、左金丸和金铃子散为基础方进行加减,在临床上取得了良好的疗效。前期针对肝胃郁热型 NERD 的临床研究已证实,清郁和降汤能有效改善患者反流、烧心等症,降低复发率^[20]。但清郁和降汤治疗 RE 的具体作用机制和作用靶点尚不明确,仍需要进一步研究探索。

本论文的研究分为三部分,第一部分为理论研究,从现代医学及中医学两个方面入手,深入探讨食管菌群改变在本病中的作用及清郁和降汤治疗本病的理论基础。第二部分为临床研究,以肝胃郁热型 RE 患者为研究对象,以质子泵抑制剂+促胃肠动力剂为对照,探讨清郁和降汤治疗本病的临床疗效及安全性。第三部分为机制研究,建立 RE 大鼠模型,采用 16S rRNA 测序技术研究反流性食管炎与食管菌群的关系,并观察清郁和降汤对反流性食管炎大鼠食管菌群及相关通路的影响,挖掘清郁和降汤的作用

机制，以期为临床上 RE 的诊治提供新思路和新方法。

第一部分 理论研究

1 食管微生物群与食管疾病关系的研究

近年来,对人体内微生物的研究是生物医学研究的热点之一。人体许多部位都有微生物的存在,如皮肤、胃肠道、食管、胆道、口腔黏膜、唾液、眼结膜、乳腺、卵泡等,包含的微生物种类有细菌、古生菌、真菌、原生生物及病毒。这种多样化的微生物群落在人体的新陈代谢、内分泌、各种生理屏障的维持、神经精神系统等方面发挥重要作用,尤其是免疫系统的功能方面作用更为显著^[21, 22]。目前在消化系统中,对肠道微生物的研究最为广泛,其数量和种类在人体微生物群中是最多的,约有40万亿个微生物,其中大多数是细菌(大约500~1000个不同的细菌种类),而病毒、古生菌、真菌和原生生物群落也与肠道上皮细胞存在着微妙的互惠关系^[23]。大量研究表明,消化道微生物菌群结构的改变与炎症性肠病、肠易激综合征、肥胖、糖尿病、过敏等疾病密切相关^[24-26]。但在消化系统中,与肠道微生态的研究相比,对食管微生物群及食管疾病研究的数量及质量都存在差距。

1.1 食管微生物群

食管连接口腔与胃,食物从口腔通过食管进入胃腔,口腔和胃对食管的微生物群有较大的影响。起初,人们认为食管缺乏自己固有的微生物群,在食管中检测到的微生物被认为是从口腔或胃内移位而来^[27]。然而,Mannel等^[28]在1983年进行的一项关键研究表明,食管有自己独特的微生物群,主要是草绿色链球菌(*Streptococci viridans*)、流感嗜血杆菌(*H. influenzae*)、奈瑟氏菌(*Neisseria*)和肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumonia*)等。Pei等^[29]利用16S rRNA测序技术对正常食管的微生物群进行了检测分析,结果显示食管菌群和口腔菌群在门水平上的组成是大致相同的,主要有6种门类,分别为厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门

(Bacteroides)、放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、梭杆菌门(Fusobacteria)和 TM7; 其中链球菌(Streptococcus)、普雷沃菌(Prevotella)和韦荣球菌(Veillonella)为优势菌种, 相对丰度分别为 39%、17%和 14%。上述研究小组后来又对健康人、RE 患者及 BE 患者的食管远端微生物群进行了进一步的研究比较, 在健康人的食管远端检测出 9 个门类 166 种细菌, 其中 92%的健康人的食管菌群以链球菌占优势^[30]。链球菌在后来的诸多研究中也证实是正常食管微生物群中的优势菌群, 并且食管中的常见菌群还包括普雷沃菌、梭杆菌和韦荣球菌等, 这些菌群共同构成了正常食管的核心微生物群^[31]。综合上述研究可知: 食管具有自身独立的定植菌群, 而并非仅有通过吞咽或胃食管反流而来的短暂停留于食管黏膜表面的过路菌。

1.2 食管微生物群与食管疾病

1.2.1 食管微生物群与胃食管反流病

有诸多学者对 GERD 患者和健康者的食管菌群进行了研究比较, 指出 GERD 患者的食管菌群与正常食管菌群相比有明显的差异, GERD 食管的优势菌群由革兰氏阳性菌向革兰氏阴性菌转变, 并且伴有菌群多样性的改变。Yang 等^[30]研究分析了正常食管、RE 及 BE 食管远端微生物的组成, 检测出了 I 型和 II 型这样 2 种具有显著差异的微生物类型。正常食管的微生物类型主要为 I 型, 以革兰氏阳性菌(如链球菌)为主; 而 RE 和 BE 的食管微生物组主要为 II 型, 含有大量的革兰氏阴性厌氧或微需氧菌(包括韦荣球菌属、普氏菌属(Prevotella)、嗜血杆菌属(Haemophilus)、奈瑟菌属、弯曲杆菌属(Campylobacter)和梭杆菌属(Fusobacterium)等)。Liu 等^[32]也对正常食管、RE 和 BE 食管的菌群进行了研究, 发现正常食管者与 RE 或 BE 患者食管下段菌群在数量上不存在差异, 但在菌群组成上存在显著差异。RE 和 BE 患者的食管菌群中普雷沃菌、梭杆菌和韦荣球菌增多, 链球菌减少, 变形菌门也减少, 其中普雷沃菌和梭杆菌分别隶属于拟杆菌门和梭杆菌门, 韦荣球菌和链球菌隶属于厚壁菌门。这一结论说明食

管菌群在 RE 和 BE 中的改变不一定是菌群绝对数量的改变,而是表现为菌群种类及其相对丰度的变化。而 Blackett 等^[15]又有不同的研究发现,他们指出革兰氏阴性菌在 RE 和 BE 患者的食管中的丰度增加,与正常食管相比优势逐渐增强,其中以弯曲杆菌的数量增加最为显著,而其他菌属的数量都有明显下降。Yu 等^[33]研究指出,我国 RE 患者食管下段菌群在总体数量和多样性方面低于健康对照组,但是组间差异无统计学意义($P>0.05$),而经 LEfSe 分析,RE 患者食管中普雷沃菌属、螺旋杆菌属、莫拉菌属与健康对照组相比丰度显著降低($P<0.05$)。

Amir 等^[34]在对烧心患者(有症状,但胃镜检查正常,食管黏膜无损伤)、RE 及 BE 患者食管菌群的研究中指出,厚壁菌门和变形菌门是食管的主要菌群,但是没有发现可以区分正常食管组织和异常食管组织(RE 和 BE)的差异菌群,也并没有观察到 Yang 等^[30]指出的 RE 和 BE 患者食管中链球菌增加这一变化。还有研究发现,与食管正常的受试者相比,在 GERD 患者的食管中发现了较多的与口腔相关的革兰氏阴性细菌分类群,其中包括纤毛菌属(*Leptotrichia*)、梭杆菌属、罗斯氏菌属(*Rothia*)、弯曲杆菌属和二氧化碳嗜纤维菌属(*Capnocytophaga*),并且认为疾病可能与具有共同特性的不同生物体的富集有关,而不是与某一种特定的生物体有关^[35]。Gall 等^[36]研究发现,BE 患者的上消化道微生物群中链球菌和普雷沃菌的丰度最高,同时还观察到链球菌和普雷沃菌的比例与 BE 发展为食管腺癌的两个已知危险因素存在相关性,这两个危险因素分别为腰臀比和食管裂孔疝长度。

综合上述研究可知,GERD 患者的食管微生物群不同于正常食管的微生物群,GERD 的发生和食管微生物群的改变有着密不可分的联系。正常食管微生物群主要由链球菌等革兰氏阳性菌组成,GERD 食管的主要微生物群是革兰氏阴性菌。革兰氏阴性菌的 LPS 可以与 TLR4 结合,激活 NF- κ B 信号通路,诱导如 IL-1 β 、IL-6、IL-8 及 TNF- α 等炎性细胞因子的过度表达,导致食管炎症的发生和发展^[37]。被激活的 NF- κ B 通路还可以

使诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的表达升高, 增加一氧化氮 (NO) 的合成, 从而引起食管下括约肌的异常松弛, 导致食管下段酸暴露时间增加; NF- κ B 信号通路的激活还可以影响 COX-2 的产生, 延缓胃排空, 最终导致 GERD 食管黏膜炎症进一步加重^[14]。

1.2.2 食管微生物群与食管腺癌及食管鳞状细胞癌

食管腺癌 (esophageal adenocarcinoma, EAC) 和食管鳞状细胞癌 (esophageal squamous cell cancer, ESCC) 是发生于食管的两个不同类型肿瘤, EAC 的发生基于 RE $\rightarrow$ BE $\rightarrow$ 不典型增生的病理生理变化。据调查显示, 近 30 年来 EAC 的发病率增长了 4 倍左右, 其发病率随着 GERD 及肥胖发病率的增加而增高^[38]。推测 EAC 发病率的激增与 20 世纪 50 年代抗生素的滥用不无关系, 滥用抗生素导致食管菌群失调, 机会致病菌致病, 加上菌群失调带来的一系列后续变化, 促使了肿瘤的发生^[39]。

有学者对 RE $\rightarrow$ BE $\rightarrow$ 肠上皮化生 $\rightarrow$ 异形增生 $\rightarrow$ EAC 变化过程中食管菌群的变化进行了研究, 发现与正常受试者及 EAC 患者相比, RE 和 BE 患者食管中弯曲杆菌属 (主要是简明弯曲菌) 富集, 而弯曲杆菌属主要在食管腺癌早期富集, 推测其可能与胃癌中的 *H. pylori* 的作用类似^[15, 40]。Mozaffari 等^[41]研究指出, 简明弯曲杆菌可能以时间依赖的方式诱导 BE 细胞表达 CDX1, 诱导了有利于 BE 向 EAC 进展的炎性微环境, 在 BE 向 EAC 发展的过程中, 简明弯曲杆菌可能是一个新的挑战。Elliott 等^[42]研究发现, 与健康对照者的食管组织相比, EAC 患者食管组织中的微生物多样性明显降低, 并且物种组成也发生改变, 发酵乳杆菌属 (*Lactobacillus fermentum*) 在 EAC 中显著富集; 乳杆菌属对低 pH 值的适应能力可使乳杆菌在部分 EAC 患者的肿瘤组织中存活, 而这部分细菌产生的乳酸可能会进一步使微环境酸化。此外, 还有研究指出, EAC 级联的特征是以革兰氏阴性菌为主, 在 EAC 级联中乳酸的产生也增加了, 乳酸代谢失调是致癌的标志之一^[35]。Zaidi 等^[43]研究发现, 在大鼠食管标本中, 与正常上皮相比, EAC 中 TLR1、TLR2、TLR3、TLR6、TLR7 和 TLR9 的表达显著上调, 菌群分析显示 BE (60%)

和 EAC (100%) 中有大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的存在; 在人类临床食管标本中, 肺炎链球菌在 GERD 和 BE 中检出的比例为 50%-70%, 而癌旁正常上皮、异型增生和 EAC 的检出比例为 20%-30%; 大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 在 BE 和 EAC 中检出, 而在癌旁正常上皮、异型增生和 GERD 组中未检出; 该研究证明了 TLR 通路和大肠杆菌之间的关联, 提示在 EAC 模型大鼠中, 早期的分子变化可能是由微生物介导的, 对人类临床样本的研究也在一定程度上证实了这一结果。综合上述研究来看, 目前对于食管微生物群与 EAC 关系的研究尚没有完全一致的结论, 但已足够证实食管微生物群在 EAC 中具有重要作用。

有关 ESCC 与食管微生物群关系的研究较少。而 ESCC 与口腔菌群关系的研究则较为深入, 口腔菌群中的牙龈卟啉单胞菌是目前较为明确的与 ESCC 发病密切相关的细菌。牙齿脱落和刷牙与 ESCC 风险显著相关, 不良的口腔卫生习惯可能导致更高的 ESCC 风险, 口腔健康指标差与 ESCC 风险呈正相关, 这些发现对于 ESCC 的一级预防有重要意义^[44]。Gao 等^[45]对正常食管和 ESCC 患者食管中牙龈卟啉单胞菌的研究指出, 在 61% 的 ESCC 癌组织和 12% 的癌旁组织中检测到了牙周致病菌牙龈卟啉单胞菌, 而在正常食管黏膜中未检测到该菌, 并且牙龈卟啉单胞菌感染与 ESCC 的多种临床病理特征呈正相关, 包括分化状态、转移和总存活率; 该研究证实 ESCC 患者的食管上皮感染了牙龈卟啉单胞菌, 该菌可能是 ESCC 的一个生物标志物, 而根除该菌可能有助于减轻 ESCC 的负担。曾有研究报道, 食管菌群的多样性与食管鳞状上皮异型增生呈负相关^[46]。然而 ESCC 的菌群与正常食管菌群的比较到底有无变化, 有何变化, 目前尚无相关报道。ESCC 食管菌群的变化期待进一步的数据和研究。

1.2.3 食管微生物群与嗜酸性粒细胞性食管炎

嗜酸性粒细胞性食管炎 (eosinophilic esophagitis, EoE) 是一种以嗜酸性粒细胞浸润为主, 由慢性免疫介导的食管炎性疾病, 其发病机制目前尚未明确。而近来有部分专家学者表示, EoE 患者食管微生物菌群的改

变可能与其发病相关。Benitez 等^[47]对 35 名非 EoE 儿童和 33 名 EoE 儿童的食管微生物群进行了研究,结果显示 EoE 患儿食管微生物群与非 EoE 对照组相比,菌群比例有显著差异,EoE 患儿中变形菌门(包括奈瑟菌属和棒状杆菌属)较丰富,而在非 EoE 对照组受试者中以厚壁菌门占优势,两组在 EoE 处于活动性炎症期间观察到的差异最大;该研究还指出有针对性的饮食干预并没有为 EoE 患儿食管微生物群带来改变,但是再次摄入高过敏性的食物会导致食管中颗粒链球菌属和弯曲菌属的富集。Harris 等^[48]研究比较活跃期 EoE 患者、缓解期 EoE 患者、GERD 患者和健康者的食管菌群,结果显示,不管是否接受治疗以及食管黏膜嗜酸性粒细胞浸润到何种程度,EoE 患者食管组织中菌群总数与健康受试者相比都会增加,并且在未接受治疗的 EoE 患者食管组织中发现嗜血杆菌(*Haemophilus*)数量显著增加。Arias 等^[49]对未经治疗的 EoE 患者和正常食管受试者的食管标本进行研究,结果发现与对照组相比,活动性 EoE 食管组织的细菌载量和 TLR1、TLR2、TLR4、TLR9 均有过高的表达,这提示食管微生物群和固有免疫在 EoE 的发病机制中发挥了一定的作用。上述研究证实,EoE 患者的食管菌群与正常食管菌群相比发生了改变,不过食管菌群的改变是怎样在 EoE 的病程中发挥作用还需要进一步研究。

1.3 PPI 对食管微生物群的影响

PPI 的研发和使用极大的推动了胃病治疗的发展。同时,PPI 的使用也让患者的胃内环境出现了巨大的改变,在使用 PPI 前胃内是具有杀菌性的强酸环境,使用之后转变为弱酸环境,上消化道和下消化道之间的酸性屏障被破坏,这一改变使部分口腔、食管等上消化道的微生物得以在胃内存活,导致部分菌群向下消化道迁移,引起肠道微生物群的变化。Jackson 等^[50]研究发现,PPI 使用者的肠道共生菌丰度显著较低,微生物多样性较低,相关的口腔和上消化道共生菌丰度显著增加,特别是链球菌科被观察到显著增加。还有研究报道,PPI 有可能改变整个人类胃肠道的正常微生物区系;在食管中,PPI 改变了正常的细菌环境,减少了食管远端对炎性

革兰氏阴性菌的暴露,这可能会降低BE的风险;在胃中,PPI改变了胃幽门螺杆菌和其他细菌的丰度和位置,这与消化性溃疡疾病和胃恶性肿瘤有关;在小肠,PPI可引起小肠细菌过度生长,而这与乳糜泻的诊断有关;在结肠中,PPI与偶发的艰难梭菌感染有关,但与复发无关^[51]。一项对12例食管炎患者在奥美拉唑治疗前和治疗1个月后胃液标本进行定量培养的研究显示,在PPI治疗前的胃液培养中,有10例是没有细菌生长的,而在使用PPI治疗后,无细菌生长的10例中有8例细菌培养呈阳性,培养出的细菌以链球菌和白色念珠菌为主^[52]。Amir等^[34]对GRED患者使用PPI治疗8周前后的食管组织和胃液进行微生物群的检测,总的来说食管组织的微生物群在PPI治疗前后是有显著差异的,PPI治疗后的食管丛毛单胞菌科(Comamonadaceae)(来自 β 变形菌门)丰度降低,来自梭菌门的梭菌科、毛螺菌科(Lachnospiraceae)和一个未分类科增加,这表明上述菌群具有很好的定居于较低酸性反流食管的能力。但也有研究提出PPI的使用对食管微生物群的分类组成没有显著影响,但是在PPI使用者中发现了三羧酸循环醋酸盐产生途径以及万古霉素和链霉素等抗生素的生物合成增加^[16]。

1.4 结语

随着专家学者们对食管微生物群的深入研究,食管微生物群的变化与常见食管疾病发生发展之间的密切关系已经得到广泛的认可。然而相关领域仍有许多待填补的空白和不足,例如食管疾病中的标志菌群以及菌群的动态变化规律都尚未明确统一。近年来,GERD、食管腺癌等食管疾病发病率逐渐升高,食管微生物群的与食管疾病关系的研究应该得到重视,这可能为食管疾病的诊治提供新的方向。

2 反流性食管炎的中医理论研究

2.1 中医病名及溯源

反流性食管炎是现代医学名词,中医没有相对应的病名,根据其临床症状归属于中医“吐酸”、“吞酸”、“嘈杂”、“暖气”、“呕吐”、

“噎膈”等范畴。《素问·至真要大论》首次记载了“吐酸”一词：“诸呕吐酸，暴注下迫，皆属于热”。《伤寒论》也有“胃气有余，噯而吞酸”的记载。《医林绳墨》指出吞酸与吐酸不同，曰“吞酸者，胃口酸水攻激于上，以至咽溢之间，不及吐出而咽下，酸味刺心，有若吞酸之状也。吐酸者，吐出酸苦之水……”。明代《医方考》记载：“吞酸，小疾也，然可暂而不可久。或以疾小而忽之，此不知其翻胃之渐也”；清代《证治百问》云：“吐酸日久，渐成翻胃”，指出了吞酸与反胃之间的关系。关于“嘈杂”的记载最早见于《丹溪心法》，其曰：“嘈杂，是痰因火动，治痰为先”。《景岳全书》对嘈杂进行了具体描述：“嘈杂一证，或作或止，其为病也，则腹中空空，若无一物，似饥非饥，似辣非辣，似痛非痛，而胸膈懊侬，莫可名状，或得食而止，或食已而复嘈，或兼恶心，而渐见胃脘作痛。”古籍中对这些病症的描述与现代反流性食管炎的各种主要症状和病情的发展变化十分相似，但是单一的病症名称不能涵盖反流性食管炎的所有临床特征。国家技术监督局 1997 年发布的《中医临床诊疗术语·疾病部》将本病称为“食管瘿”，但“食管瘿”这一病名在临床上的使用有限，没有得到广泛的普及。目前仍旧以患者的主症命名为主，本病病名还有待进一步研究和完善^[53]。

2.2 病因病机

2.2.1 古代医籍中病因病机的论述

古代医籍中对本病病因的认识大致可分为外因和内因两大部分。外因主要是外感六淫，内因包括内生邪气、脾胃虚弱、情志失调、饮食不节等。

关于外因，李东垣《脾胃论》中有言：“胃肠为市，无物不受，无物不入，若风、寒、暑、湿、燥一气偏胜，亦能伤脾损胃”。陈世铎《辨证录》曰：“春月伤风……口苦，两胁胀满，或吞酸吐酸”，指出外感风邪可导致吞酸吐酸。《景岳全书》中提到：“凡肌表暴受风寒，则多有为吞酸者……故凡寒气一入，则胃中阳和之气被抑不舒。所以滞浊随见，而即刻见酸。”寒为阴邪，易伤阳气，若寒邪侵袭人体，郁遏阳气升发，气机

阻滞不通，浊气上逆则成吐酸。《证治补汇》亦云：“若客寒犯胃，顷刻成酸，本无郁热，风寒所化者，酸之寒也。”

内因涉及内生邪气、脾胃虚弱、情志失调、饮食不节等多个方面。《素问·至真要大论》记载：“诸呕吐酸，暴注下迫，皆属于热”，“诸逆冲上，皆属于火”，古人认为吐酸等症由内生火热之邪所致。刘完素在《素问玄机原病式》中也提到：“烦渴呕吐，皆热证也，其必吐酸，为热明矣”，指出吐酸为“火气炎上故也”。《寿世保元》中记载“湿热在胃口上，饮食入胃，被湿热郁遏，食不得化，故作吞酸”，言明湿热之邪氤氲中焦阻碍运化，饮食停滞，气机升降失职，气逆于上，出现吞酸之症。薛己《内科摘要·脾胃亏损吞酸暖腐》中提到：“脾胃亏损，吞酸暖腐”，明确指出脾胃虚弱可导致本病。张景岳《杂证谟·吐酸》曰：“吞酸等证，总由停积不化而然，而停积不化，又总由脾胃不健而然”。《景岳全书》中亦云“凡病吞酸者，多见饮食不快，自食有不快，必渐至中满、泄泻等证，岂非脾气不强，胃脘阳虚之病，而犹认为火，能无误乎？”进一步表明脾胃虚弱是本病的重要病因。无论是先天禀赋不足，亦或是后天脾胃受损而致脾胃虚弱，皆可因脾胃纳运不及，气机升降失常，胃失和降，而出现吐酸等症。《济生方·宿食门》有云：“善摄生者，谨于和调，一饮一食，使之胃中，随消随化，则无滞留之患；若禀受怯弱，饥饱失时，或过餐五味，鱼腥乳酪，强食生冷瓜果菜，停蓄胃脘，遂结宿滞。轻则吞酸呕恶，胸满噎噎，或泄或利……”《三因极一病证方论·醋噎证治》曰：“夫中脘有饮噎嘈，有宿食则酸，食后噎醋吞酸，皆宿食证。”以上论述表明饮食不节、偏嗜生冷及肥甘厚腻等不良饮食习惯均可导致脾胃运化功能失司，宿食停滞，中焦气机壅滞不通，浊气上逆而致吞酸、嘈杂等症。《素问玄机原病式·六气为病·吐酸》曰：“酸者，肝木之味，由火盛制金，不能平木，则肝木自甚故为酸也。”《临证备要·吞酸》曰：“胃中泛酸，嘈杂有烧灼感，多因于肝气犯胃。”若因情志不遂，导致肝郁气滞，横逆犯胃，胃失和降，胃气上逆，则可发为本病。《顾松园医镜》云：“吞酸

因胃中湿热，郁遏肝火所致。盖湿郁则热，热郁则酸；以酸为肝木之味，故责之肝火……其有因伤食吞酸，因痰饮吐酸者，以消食消痰为主……有老人胃气虚弱，口吐酸水不止者，宜补胃气为主”，认为肝火、痰饮、伤食、胃气虚弱皆为吞酸的病因。

2.2.2 现代医家对病因病机的论述

随着医学的发展，许多专家学者在古代医籍的基础上，结合自身临床经验，对反流性食管炎的病因病机进行了总结和发挥。

有学者认为本病以实证为主。金小晶教授认为反流性食管炎以“食积、气滞、寒凝”为主要病因，倡导将“通法”贯穿于治疗始终，临证活用消导、疏通、温通等治法^[54]。徐景藩国医大师认为反流性食管炎病变涉及的脏腑有胃、肝、肺，胃气上逆为病之根本，胃气当降不降，反而上逆，胃酸随之上泛食管而为病；同时情志失调，肝气失疏，或是肺失肃降，均可致中焦气机升降失常而致胃气上逆^[55]。刘万里教授认为“气逆、热逆、浊逆、酸逆”可以涵盖反流性食管炎的病机要点，其中“气逆”指的是胃气上逆，“酸逆”指的是胃酸上逆，“热逆”因肝胃郁热所致，“浊逆”为脾虚生痰所致，“气逆”为本，“酸逆”为标，“热逆”和“浊逆”为病机的关键，刘教授针对此病机提出了“降气清热，化浊制酸”的治疗大法，解决“气逆”、“热逆”和“浊逆”，则“酸逆”自愈^[56]。而赵荣莱教授独创“膈中积气”论，认为反酸烧心、胸满脘胀、咽喉噎塞等症皆因胸阳失展、膈中积气，膈气不降、胃气上逆所致，治疗时以透膈利气、斡旋升降为大法^[57]。

有学者认为本病以虚证为主。龙惠珍教授认为反流性食管炎的病机可以总结为胃气失和、气机上逆。临床证型以胃阴亏虚多见。胃的受纳腐熟功能有赖于胃阴的滋养，胃中津液亏虚，胃失濡润，通降功能受损，胃气不降反升，故发为本病。治疗时强调以滋阴养胃降逆为大法，顾护胃中阴液，切忌纯用理气之品^[58]。

有学者认为本病多虚实夹杂。谢晶日教授则认为反流性食管炎的本质是本虚标实，其中“脾虚运化无力”为本，“浊气上逆、胃失和降”为标，肝失疏泄为关键诱因。若脾虚生化乏源，致贲门肌肉失养，食管括约肌关闭不利，则可出现反酸；若肝失条达，气机失疏，横逆反胃，则致胃气上逆而出现反酸。治疗时兼顾健脾助运与疏肝泄热，以达到生肌和胃、降逆制酸的目的^[59]。杨春波国医大师认为内生及外感的湿热之邪为本病的主要病因。脾胃受湿热之邪所困，气机升降失调，清气不升，浊气不降，胃气携胃酸上逆于食管，则出现反流、烧心等症状。湿热之邪交蒸，难以速解，因此本病多反复发作、缠绵难愈。湿热日久又会进一步损伤脾胃，导致脾胃虚弱，运化无力。杨老还提出本病的后期亦可因脾胃虚弱而致肾虚，此肾虚多见肾阴阳失调，虚阳浮越。由此可见，反流性食管炎的病机是复杂多变的，在临证时当精准辨证，随证治之^[60]。

反流性食管炎的病因病机纷繁众多，专家学者们根据自己的实践经验，对病因病机都持有各自的观点，但总的来说，不外乎胃失和降，浊气上逆。在临证时需要明辨虚实、寒热，谨守病机；治疗时标本兼顾，方能达到症状缓而病机解，病因消而疾病愈的目的。

2.3 辨证施治

2.3.1 共识指南中的辨证施治

2009年制定的《胃食管反流病中医诊疗共识意见》^[61]将胃食管反流病分为5种证型，包括肝胃郁热证、胆热犯胃证、中虚气逆证、气郁痰阻证和瘀血阻络证，分别予以柴胡疏肝散合左金丸、龙胆泻肝汤合温胆汤、四逆散合六君子汤、旋覆代赭汤合半夏厚朴汤、血府逐瘀汤加减治疗。此后，胃食管反流病的中医证治逐渐得到更新和完善。2017年发布的《胃食管反流病中医诊疗专家共识意见》^[62]在2009年共识的基础上对证型及治疗方案等方面进行了补充修改。首先是增加了脾胃虚热证，这一证型符合当代脾胃病多郁、多热的特点^[63]，针对脾胃虚热证建议采用的方剂是黄连汤加减；其次是胆热犯胃证的主方改为小柴胡汤合温胆汤加减，气郁痰

阻证的主方改为半夏厚朴汤加减；此外还增加了 10 种已被实验及临床证实有效的针对不同证型的中成药，如适用于气郁食滞的开胸顺气丸、适用于肝胃郁热的达立通颗粒，适用于脾虚气滞的甘海胃康胶囊等等。

2.3.2 经方论治

半夏泻心汤为张仲景所创，是辛开苦降、寒温并用、阴阳互调的代表方剂，现代研究证实其在治疗反流性食管炎方面疗效显著。曹翠纳等^[64]选取 72 例寒热错杂型 RE 患者，随机分为中药组（半夏泻心汤）、西药组（雷贝拉唑）和联合组（半夏泻心汤+雷贝拉唑）进行临床研究，结果显示联用组综合疗效的总有效率、胃镜疗效的总有效率和降低主要症状积分方面显著优于中药组和西药组（中药组和西药组疗效相当），在改善焦虑状态和睡眠质量方面联用组和中药组疗效显著优于西药组，充分证实了半夏泻心汤能有效改善 RE 临床症状，促进食管黏膜愈合。旋覆代赭汤亦出自张仲景，原方是为治疗痰气痞证所设，现广泛用于临床，疗效显著。吴振华等^[65]将 60 例胃阴不足型 RE 患者纳入研究，治疗组予旋覆代赭汤，对照组予奥美拉唑，疗程为 8 周，结果显示治疗组总有效率、胃镜有效率分别为 93%、83%，明显高于对照组的总有效率和胃镜有效率（80%、73%）（ $P<0.05$ ），同时临床症状积分改善也明显优于对照组（ $P<0.05$ ），表明旋覆代赭汤加减治疗胃阴不足型 RE 能显著改善临床有效率及症状评分。刘菊等^[66]运用旋覆代赭汤干预 RE 模型大鼠，发现其发挥疗效的机制可能与抑制食管组织及外周血中炎性因子的表达有关。有学者用 Meta 分析评价半夏泻心汤、旋覆代赭汤、小柴胡汤和四逆散这 4 种经方对此 PPI 治疗 RE 的临床疗效，结果显示这 4 种经方与 PPI 合用疗效优于单用 PPI^[67]。

2.3.3 自拟方论治

通降颗粒是中国中医科学院唐旭东教授根据自身临床经验，在名老中医董建华“通降理论”的基础上创制出的中药复方，是针对肝胃不和病机而设，治法为疏肝和胃、理气通降。李保双等^[68]对比通降颗粒和奥美拉唑治疗肝胃不和型 NERD 患者临床疗效，结果显示通降颗粒在总有效率，反

酸、情志烦躁和抑郁积分，身体疼痛、情感智能评分的改善方面显著优于奥美拉唑，研究结果证实，通降颗粒疗效确切，可有效提高患者生活质量。程正义^[69]通过建立肝胃不和型大鼠模型，研究通降颗粒治疗 RE 的机制，结果显示，通降颗粒可通过调节胃肠激素促进胃肠动力来发挥作用。徐景藩教授针对肝胃郁热、胃气上逆的病机，以左金丸合橘皮竹茹汤为基础，总结出了泄热和胃方，临床疗效显著^[70]。疏肝和胃颗粒是朱生樑教授脾胃病辨治体系的系列方之一，针对肝胃郁热证而设。王阿会等^[71]将 94 例肝胃郁热型 RE 患者纳入临床研究，分别运用疏肝和胃颗粒和奥美拉唑进行治疗，结果显示疏肝和胃颗粒临床及胃镜总有效率（95.74%、80.00%）显著高于奥美拉唑（76.60%、63.89%）（ $P<0.05$ ），临床症状积分的改善显著优于奥美拉唑（ $P<0.05$ ），证实疏肝和胃颗粒可以有效提高 RE 临床疗效，改善临床症状。冯珍凤等^[72]提出肾气敛降无力，冲气上激是导致胃气上逆的原因之一，在胃-冲脉-肾相关理论的指导下创制了经验方平冲降逆汤，并招募了 100 例 RE 的患者，随机分成平冲降逆组和奥美拉唑组，对比两组的临床症状评分和胃镜下炎症改善情况，结果表明平冲降逆汤临床症状有效率及胃镜下炎症改善有效率（94%、83.78）明显高于奥美拉唑（78%、71.43%）（ $P<0.05$ ）。

2.3.4 中医特色外治

近年来，越来越多的研究表明，中医特色外治在 RE 的治疗方面确有疗效。贾剑南等^[73]选取 62 例瘀血阻络型难治性 RE 患者，随机分为西药组（雷贝拉唑、铝碳酸镁、依托必利）、中药组（活血通降方）和针药并用组（活血通降方，针刺足三里、中脘、内关等穴），结果显示在症状学改善方面针药并用组优于另外两组，半年内复发率针药并用组和中药组优于西药组，表明中药内服联用针灸外治在改善瘀血阻络型 RE 消化道症状、降低复发率方面有明显优势。徐因等^[74]选取 66 例 GERD 患者，随机分成两组，治疗组予北京中医医院王乐亭先生的经验针方“老十针”（取天突、上脘、中脘、天枢等穴），对照组予奥美拉唑口服，治疗 28 天后，观察

到治疗组与对照组相比有效性明显升高 ($P < 0.05$), 而治疗组与对照组在安全性方面相比无显著差异 ($P > 0.05$), 同样安全可靠。易越等^[75]人运用数据挖掘技术探索了治疗 RE 的选穴规律, 得到的结果是治疗 RE 的核心穴对是“中脘-足三里”, 核心腧穴处方为“中脘、足三里、内关”, 为规范 RE 的针灸治疗提供了一定的参考。吕慧娟^[76]对胃虚胆热证的 RE 患者采用麦粒灸, 取四花穴(膈俞、胆俞), 取得了良好疗效。高玮等^[77]对旋覆代赭汤加减联合穴位埋线治疗肝胃不和型 RE 的效果进行了临床研究, 以莫沙比利作为对照, 结论显示旋覆代赭汤加减联合穴位埋线在减轻患者炎症反应, 抑制反酸、胸痛等临床症状的发生方面效果优于对照组。

2.4 结语

现代中医学者根据历代医家对该病的记载, 结合自身临床实践经验, 对本病做了深入的研究, 对其病因病机及治疗等方面的认识逐步完善, 中医药治疗大法基本得到认同, 临床应用时在改善症状、促进食管黏膜修复、降低复发率等方面取得了良好的效果。但是中医研究目前也有许多短板, 首先是目前的研究整体水平不高, 缺少设计严谨、大样本、多中心的临床研究, 多数研究不足以代表总体情况; 其次是由于临床病例的多样化以及临床医家辨证论治思维的灵活性, 对于本病的治疗难以达到系统规范化的统一, 例如对具体治疗方法、方剂、药量的选择等; 最后是实验研究, 动物实验的设计和执行为不能很好的用中医理论去解释。因此, 在今后的研究中, 我们不仅要严格规范科研设计, 建立符合中医药特点的评价模型和更加科学的药效评价标准, 还需要将前人有效经验与现代科学研究手段紧密结合起来, 深入挖掘研究中医药治疗反流性食管炎的作用机制, 指导临床更有效的治疗反流性食管炎。

第二部分 临床研究

清郁和降汤治疗肝胃郁热型反流性食管炎的临床疗效观察

反流性食管炎（RE）是一种常见的消化系统疾病，当胃、十二指肠内容物病理性流入食管时，会导致食管黏膜出现炎症、糜烂甚至溃疡。近年来，随着人们生活习惯和饮食结构的改变，社会压力和精神压力的增加，该病在我国的发病率逐年上升^[19]。RE 若控制不佳，不仅会引起上消化道出血、食管狭窄，还会增加向 Barrett 食管（BE）、食管腺癌（EAC）发展的风险，严重影响患者身体健康，并给患者带来沉重的经济负担和极大的精神压力。治疗上目前质子泵抑制剂是首选药物，可有效缓解症状、促进食管黏膜愈合，但有研究指出长期使用质子泵抑制剂可出现营养缺乏、胃肠炎风险增加、骨质疏松和骨折、缺血性心脏病、慢性肾损伤等各种副作用，还存在复发率高和药物依赖性问题^[78]；抗反流手术等侵入性治疗具有高风险，长期疗效有待进一步研究证实，尚不能完全替代抑酸药物治疗。

近年来，中医药在治疗 RE 方面优势凸显，通过个性化的辨证论治不仅能显著改善患者症状，不良反应少，还可降低复发率，有效提高了患者生活质量。深化中医药对 RE 治疗的研究，可以为广大患者带来福音，具有广阔的前景。导师叶松教授在消化系统疾病的诊治方面积累了丰富的经验，通过长期临证总结，认为 RE 患者中肝胃郁热证最为常见，并针对这一证型确立了“疏肝清热、和胃降逆”的治疗大法，以柴胡疏肝散、左金丸和金铃子散为基础总结出经验方“清郁和降汤”。为客观评价清郁和降汤的临床疗效，本课题纳入了 94 例肝胃郁热型 RE 患者，分为西药组、中药组和中西药联用组，分别予以雷贝拉唑钠肠溶胶囊+枸橼酸莫沙比利分散片、清郁和降汤、雷贝拉唑钠肠溶胶囊+枸橼酸莫沙比利分散片+清郁和降汤进行治疗，对比 RE 患者症状改善情况、胃镜下食管黏膜改善情况、

焦虑量表（SAS）、远期疗效等指标，以期为中医辨证论治本病提供临床依据。

1 病例来源

纳入病例均为 2021 年 5 月-2021 年 10 月间于湖北省中医院花园山院区脾胃病科就诊，并诊断为肝胃郁热型反流性食管炎的患者。按随机数字表法将患者随机分为清郁和降汤组（中药组）、质子泵抑制剂+促胃肠动力剂组（西药组）、清郁和降汤+质子泵抑制剂+促胃肠动力剂组（中西药联用组）。

1.1 诊断标准

1.1.1 西医诊断标准

参照 2017 年《胃食管反流病中西医结合诊疗共识意见》^[5]：

①临床表现：有典型的烧心和反流症状，非典型症状主要包括胸痛（胸痛患者需先排除心脏因素）、上腹部烧灼感、上腹痛、上腹胀、嗝气等。

②胃食管反流病问卷量表（Gerd Q）评分 ≥ 8 分；

③RE 内镜下诊断和分级：

正常：食管黏膜无破损；

A 级：食管黏膜有破损，但未融合，长径小于 5 mm；

B 级：食管黏膜有破损，但未融合，长径大于 5 mm；

C 级：食管黏膜破损相互融合，范围小于 75%的食管周径；

D 级：食管黏膜破损相互融合，范围大于 75%的食管周径。

1.2.2 中医证候诊断标准

参照 2017 年《胃食管反流病中医诊疗专家共识意见》^[62]：

肝胃郁热证

主症：①烧心；②反酸。

次症：①胸骨后疼痛；②胃脘灼痛；③脘腹胀满；④嗝气；⑤心烦易怒；⑥嘈杂易饥；⑦口干口苦；⑧大便秘结。

舌脉：①舌红，苔黄；②脉弦。

证型确定：主症必备，加次症 2 项及以上，参考舌脉，即可诊断。

1.3 纳入标准

- ①年龄在 18 岁至 65 岁之间；
- ②符合反流性食管炎西医诊断标准；
- ③中医辨证为肝胃郁热证；
- ④4 周内未服用抑酸剂和其他影响胃肠道功能的药物；
- ⑤患者自愿签署本研究的知情同意书。

1.4 排除标准

- ①妊娠期或哺乳期妇女；
- ②有食管狭窄、消化性溃疡、消化道肿瘤、上消化道出血、食管裂孔疝等疾病，以及其他原因引起的食管炎（如霉菌性食管炎等）；
- ③既往有消化道手术史患者；
- ④有严重的心脑血管疾病、肝肾功能不全、精神疾病以及其他系统疾病的患者；
- ⑤入选前 4 周内接受过抗生素等对试验结果有影响的药物治疗者；
- ⑥对受试药物过敏患者；
- ⑦正在参加其他临床试验者。

1.5 入组病例一般情况

本研究共纳入病例 94 例，脱落 4 例，完成研究 90 例，其中中药组 30 例、西药组 30 例、中西药联用组 30 例。

1.5.1 一般资料比较

三组性别经 χ^2 检验， $P>0.05$ ，差异无统计学意义；三组年龄、病程经单因素方差分析， $P>0.05$ ，差异无统计学意义。三组在性别构成、年龄、病程方面具有可比性。见表 1。

表 1 三组一般资料的比较

分组	例数	男/女 (例)	年龄 (岁)	病程 (月)
中药组	30	13/17	44.03±13.47	17.60±7.49
西药组	30	12/18	42.10±12.61	17.90±7.43
中西药联用组	30	14/16	45.43±2.11	18.17±7.37
χ^2/F 值		0.271	0.518	0.044
P 值		0.873	0.598	0.957

1.5.2 三组治疗前 Gerd Q 量表总积分比较

治疗前三组 Gerd Q 量表总积分, 采用单因素方差分析, $P>0.05$, 差异无统计学意义。见表 2。

表 2 各组治疗前 Gerd Q 量表总积分比较 ($\bar{x}\pm s$)

分组	例数	总积分	F 值	P 值
中药组	30	13.40±3.00		
西药组	30	13.13±2.79	0.074	0.928
中西药联用组	30	13.37±2.95		

1.5.3 三组治疗前中医症状总积分比较

治疗前三组中医症状总积分, 采用单因素方差分析, $P>0.05$, 差异无统计学意义。见表 3。

表 3 各组治疗前中医症状总积分比较 ($\bar{x}\pm s$)

分组	例数	总积分	F 值	P 值
中药组	30	20.87±6.39		
西药组	30	21.83±6.51	0.346	0.708
中西药联用组	30	20.47±6.715		

1.5.4 三组治疗前中医症状单项积分比较

治疗前三组中医症状单项积分, 采用多样本秩和检验, $P>0.05$, 差异均无统计学意义。见表 4。

表 4 各组治疗前中医症状单项积分比较 (M (P25, P75))

症状	中药组	西药组	中西药联用组	H 值	P 值
烧心	4 (2, 4.5)	4 (4, 6)	4 (2, 6)	1.377	0.502
反酸	4 (4, 6)	5 (4, 6)	4 (2, 6)	2.410	0.300
胸骨后疼痛	1 (1, 2)	2 (1, 2)	2 (1, 3)	1.296	0.523
胃脘灼痛	2 (1, 2)	2 (1, 2)	2 (1, 3)	0.433	0.805
脘腹胀满	2 (1.75, 3)	2 (1, 2.25)	2 (1, 2)	2.489	0.288
嗳气	2 (1, 2)	2 (1, 2.25)	2 (1, 2)	1.273	0.529
心烦易怒	2 (1, 2)	2 (1, 2)	1 (1, 2)	5.156	0.076
嘈杂易饥	1 (0, 2)	1 (1, 2)	1 (1, 2)	1.407	0.495
口干口苦	2 (2, 2)	2 (1, 3)	2 (1, 2)	1.084	0.582
大便秘结	1 (0.75, 2)	1 (0, 2)	1 (0, 2)	0.283	0.868

1.5.5 三组治疗前 SAS 总评分比较

治疗前三组 SAS 总评分, 采用单因素方差分析, $P>0.05$, 差异无统计学意义。见表 5。

表 5 各组治疗前 SAS 总评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	总评分	F 值	P 值
中药组	30	57.00±14.32	0.033	0.968
西药组	30	57.90±14.24		
中西药联用组	30	57.67±14.61		

1.5.6 三组治疗前胃镜下 RE 分级比较

治疗前三组胃镜下 RE 分级, 经秩和检验, $P>0.05$, 差异无统计学意义。见表 6。

表 6 各组治疗前胃镜下分级比较

分组	例数	A 级[例 (%)]	B 级[例 (%)]	C 级[例 (%)]	P 值
中药组	30	20 (66.7%)	7 (23.3%)	3 (10.0%)	0.850
西药组	30	18 (60.0%)	8 (26.7%)	4 (13.3%)	
中西药联用组	30	19 (63.3%)	6 (20.0%)	5 (16.7%)	

2 治疗方案

2.1 治疗药物

2.1.1 中药组：

清郁和降汤，基本药物组成：柴胡 10g、枳壳 10g、厚朴 10g、炒莱菔子 15g、陈皮 10g、砂仁 6g、黄连 6g、吴茱萸 3g、佛手 10g、香橼皮 10g、郁金 10g、延胡索 10g、川楝子 10g、赤白芍各 10g、海螵蛸 10g。上述药物由我院药剂科煎制，均为标准汤剂 200ml/袋。服用方法：每日 2 次，每次 1 袋，早、晚饭后半小时温服。

2.1.2 西药组：

雷贝拉唑钠肠溶胶囊（商品名：雨田青，珠海润都制药股份有限公司生产），批准文号：国药准字 H20110076。服用方法：每日 1 次，每次 20mg，早餐前半小时口服。

枸橼酸莫沙比利分散片（商品名：新洛纳，成都康弘药业集团股份有限公司），批准文号：国药准字 H20031110。服用方法：每日 3 次，每次 5mg，餐前半小时口服。

2.1.3 中西药联用组：

予清郁和降汤联合雷贝拉唑钠肠溶胶囊、枸橼酸莫沙比利分散片口服，方法同上。

2.1.4 疗程及治疗过程中注意事项

以上三组疗程均为 8 周，治疗过程中每 2 周复诊一次。治疗前后分别填写 Gerd Q 量表、中医症状量化分级评分表、SAS 量表。疗程结束 3 月

后进行 1 次随访，并填写 Gerd Q 量表。治疗期间嘱患者清淡饮食，忌食辛辣、油腻、茶、咖啡，控制烟酒，睡前不进食，进餐后不立即卧床，床头调高 10-15cm，调畅情志。避免服用与本病相关的其他治疗药物。

3 观察项目

3.1 疗效性指标

①Gerd Q 总积分：比较治疗前后胃食管反流病问卷量表（Gerd Q）总积分变化，量表见附表 1。

②中医症状分级量化积分：参照《中药新药临床研究指导原则》，制定中医症状量化分级评分表，将主症烧心、反酸按照无、轻、中、重四个等级分别记为 0 分、2 分、4 分、6 分，将次症胸骨后疼痛、胃脘灼痛、脘腹胀满、嗝气、心烦易怒、嘈杂易饥、口干口苦、大便秘结按照无、轻、中、重四个等级分别记为 0 分、1 分、2 分、3 分。舌脉象列入观察指标，不计分。量表见附表 2。

③焦虑量表（SAS）评分：采用焦虑自评量表（SAS）来进行精神心理评分调查，各包含 20 个条目，每个条目按症状出现的频率分为 1、2、3、4 级，按评分标准计分，分别把 20 题的得分相加得到总分，总分乘以 1.25，得到标准分。分值越高，焦虑倾向越明显。观察治疗前后 SAS 积分变化，量表见附表 3。

④胃镜检查：观察治疗前后食管黏膜损伤变化情况。

3.2 安全性指标

①一般体格检查项目。

②血、尿、粪三大常规化验，肝肾功能及心电图，治疗前后各查 1 次。

③不良反应随时监测和记录。

4 疗效评定标准

4.1 Gerd Q 量表总积分评定

根据胃食管反流病问卷量表（Gerd Q）积分标准评分，比较治疗前后

Gerd Q 总积分变化, 并组间比较。

4.2 中医症状积分评定

分别计算治疗前后症状积分的变化, 并进行组内、组间比较。

4.3 中医症状综合疗效评定标准

采用尼莫地平法计算。疗效指数=[(治疗前症状总积分-治疗后症状总积分) / 治疗前症状总积分] × 100%。参照《中药新药临床研究指导原则》拟定。

痊愈: 症状消失, 疗效指数 ≥ 95%;

显效: 症状基本消失, 即使偶发但很快消失, $70\% \leq \text{疗效指数} < 95\%$;

有效: 症状没有消失, 但是有所好转, $30\% \leq \text{疗效指数} < 70\%$

无效: 症状未见改善, 甚或加重, 疗效指数 $< 30\%$ 。

总有效率=(痊愈+显效+有效) / 总例数 × 100%

4.4 胃镜疗效评定标准

治疗前后胃镜下食管黏膜炎症改善情况, 参照《胃食管反流病中西医结合诊疗共识意见(2017)》^[5]。

治愈: 治疗后内镜下食管黏膜正常。

有效: 治疗后食管黏膜表现改善 ≥ 1 个级别。

无效: 治疗后食管黏膜改善不明显。

总有效率=(治愈+有效) / 总例数 × 100%

4.5 焦虑量表

计算治疗前后 SAS 评分, 并进行比较, 治疗后评分较治疗前下降并有统计学意义为有效。

4.6 远期疗效

疗程结束 3 个月后对治疗有效、显效及痊愈的病例随访, 随访时填写的 Gerd Q 量表, 并与疗程结束时 Gerd Q 量表总积分进行比较。

5 统计学处理

使用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$

表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD法;非正态分布的计量资料用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,采用秩和检验;计数资料组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

6 研究结果

6.1 Gerd Q 量表结果

三组Gerd Q量表治疗前后总积分结果见表7。中药组、西药组、中西药联用组治疗后积分均较治疗前显著降低($P < 0.01$);治疗后,中药组与西药组总积分相比差异无统计学意义($P > 0.05$),中西药联用组总积分与中药组、西药组相比显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表7 各组治疗前后 Gerd Q 量表总积分比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	治疗前	治疗后	P 值
中药组	13.40 ± 3.00	8.20 ± 2.54	<0.01
西药组	13.13 ± 2.79	8.50 ± 2.40	<0.01
中西药联用组	13.37 ± 2.95	6.90 ± 2.51 ^{1) 2)}	<0.01
P 值	0.928	0.034	

注:与中药组治疗后相比,¹⁾ $P < 0.05$;与西药组治疗后相比,²⁾ $P < 0.05$;

6.2 中医症状综合疗效评定结果

三组中医症状综合疗效评定结果见表8。中药组总有效率为93.33%,西药组总有效率为90.00%,中西药联用组总有效率为96.67%,经秩和检验, $P > 0.05$,差异无统计学意义。

表8 各组中医症状综合疗效评定

分组	例数	无效[例(%)]	有效[例(%)]	显效[例(%)]	痊愈[例(%)]	P 值
中药组	30	2 (6.7%)	15 (50.0%)	13 (43.3%)	0 (0.0%)	0.176
西药组	30	3 (10.0%)	18 (60.0%)	9 (30.0%)	0 (0.0%)	
中西药联用组	30	1 (3.3%)	14 (46.7%)	13 (43.3%)	2 (6.7%)	

6.3 中医症状总积分评定结果

三组治疗前后中医症状总积分结果见表 9。中药组、西药组、中西药联用组治疗后中医症状总积分均较治疗前显著降低 ($P<0.01$)；治疗后，中药组中医症状总积分比西药组低，但差异无统计学意义 ($P>0.05$)，中西药联用组总积分与中药组、西药组相比均显著降低 ($P<0.05$)。

表 9 各组治疗前后中医症状总积分比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	治疗前	治疗后	P 值
中药组	20.87 $\pm$ 6.39	7.77 $\pm$ 3.82	$P<0.01$
西药组	21.83 $\pm$ 6.51	8.90 $\pm$ 4.38	$P<0.01$
中西药联用组	20.47 $\pm$ 6.715	5.67 $\pm$ 3.16 ^{1) 2)}	$P<0.01$
P 值	0.708	0.005	

注：与中药组治疗后相比，¹⁾ $P<0.05$ ；与西药组治疗后相比，²⁾ $P<0.05$ ；

6.4 中医症状单项积分评定结果

三组治疗前后中医主要症状积分结果见表 10。中药组、西药组、中西药联用组治疗后主要症状烧心、反酸积分均较治疗前显著降低 ($P<0.01$)；治疗后，西药组、中西药联用组烧心积分均显著低于中药组 ($P<0.05$)，中西药联用组烧心积分低于西药组，但两组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)，中药组、西药组、中西药联用组治疗后反酸积分的差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

三组治疗前后中医次要症状积分结果见表 11。中药组、西药组、中西药联用组治疗后胸骨后疼痛、胃脘灼痛、脘腹胀满、嗝气、心烦易怒、嘈杂易饥、口干口苦、大便秘结的积分均较治疗前显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；治疗后，中药组、西药组、中西药联用组胸骨后疼痛、胃脘灼痛、脘腹胀满、嘈杂易饥积分的差异均无统计学意义 ($P>0.05$)；治疗后嗝气的积分，中西药联用组低于西药组 ($P<0.05$)，中西药联用组低于中药组，但差异无统计学意义 ($P<0.05$)，中药组低于西药组，但差异无统计学意义 ($P<0.05$)；治疗后心烦易怒、口干口苦、大便秘结

的积分, 中药组、中西药联用组均显著低于西药组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 中药组与中西药联用组差异无统计学意义 ($P<0.05$)。

表 10 各组治疗前后中医主要症状单项积分比较 (M (P25, P75))

主要症状	中药组		西药组		中西药联用组	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
烧心	4 (2, 4.5)	2 (0, 2) ²⁾	4 (4, 6)	0 (0, 2) ^{2) 3)}	4 (2, 6)	0 (0, 2) ^{2) 3)}
反酸	4 (4, 6)	2 (0, 2) ²⁾	5 (4, 6)	2 (0, 2) ²⁾	4 (2, 6)	0 (0, 2) ²⁾

注: 与治疗前相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与中药组治疗后相比, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$; 与西药组治疗后相比, ⁵⁾ $P<0.05$, ⁶⁾ $P<0.01$ (表 10 同)

表 11 各组治疗前后中医次要症状单项积分比较 (M (P25, P75))

次要症状	中药组		西药组		中西药联用组	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
胸骨后疼痛	1 (1, 2)	1 (0, 1) ²⁾	2 (1, 2)	0 (0, 1) ²⁾	2 (1, 3)	0 (0, 1) ²⁾
胃脘灼痛	2 (1, 2)	1 (0, 1) ²⁾	2 (1, 2)	0.5 (0, 1) ²⁾	2 (1, 3)	1 (0, 1) ²⁾
脘腹胀满	2 (1.75, 3)	1 (1, 1) ²⁾	2 (1, 2.25)	1 (1, 1) ²⁾	2 (1, 2)	1 (0, 1) ²⁾
嗳气	2 (1, 2)	1 (0, 1) ²⁾	2 (1, 2.25)	1 (1, 1) ²⁾	2 (1, 2)	0.5 (0, 1) ^{2) 5)}
心烦易怒	2 (1, 2)	0 (0, 1) ^{2) 6)}	2 (1, 2)	2 (1, 2) ²⁾	1 (1, 2)	0.5 (0, 1) ^{2) 6)}
嘈杂易饥	1 (0, 2)	0 (0, 1) ²⁾	1 (1, 2)	0 (0, 1) ²⁾	1 (1, 2)	0 (0, 1) ²⁾
口干口苦	2 (2, 2)	1 (0, 1) ^{2) 6)}	2 (1, 3)	1 (1, 2) ²⁾	2 (1, 2)	1 (0, 1) ^{2) 6)}
大便秘结	1 (0.75, 2)	0 (0, 0) ^{2) 6)}	1 (0, 2)	1 (0, 1) ¹⁾	1 (0, 2)	0 (0, 1) ^{2) 5)}

6.5 胃镜疗效评定结果

三组治疗后胃镜疗效评定结果见表 12、表 13。治疗后三组胃镜下 RE 分级, 经秩和检验, $P>0.05$, 差异无统计学意义。中药组、西药组、中西药联用组胃镜下炎症改善有效率分别为 86.67%、93.33%、96.67%, 经秩和检验, $P>0.05$, 差异无统计学意义。

表 12 各组治疗后胃镜下分级比较

分组	例数	正常[例 (%)]	A 级[例 (%)]	B 级[例 (%)]	P 值
中药组	30	18 (60.0%)	10 (33.3%)	2 (6.7%)	0.338
西药组	30	18 (60.0%)	9 (30.0%)	3 (10.0%)	
中西药联用组	30	23 (76.7%)	5 (16.7%)	2 (6.7%)	

表 13 各组治疗后胃镜下炎症改善有效率比较

分组	例数	无效[例 (%)]	有效[例 (%)]	治愈[例 (%)]	P 值
中药组	30	4 (13.3%)	8 (26.7%)	18 (60.0%)	0.261
西药组	30	2 (6.7%)	10 (33.3%)	18 (60.0%)	
中西药联用组	30	1 (3.3%)	6 (20.0%)	23 (76.7%)	

6.6 焦虑量表评分结果

三组治疗后焦虑量表总评分前后比较结果见表 14。中药组、西药组、中西药联用组治疗后焦虑量表评分均较治疗前显著降低 ($P<0.01$)；治疗后，中药组、中西药联用组焦虑评分显著低于西药组 ($P<0.05$)，中药组与中西药联用组焦虑评分差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 14 各组治疗前后 SAS 总评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	治疗前	治疗后	P 值
中药组	57.00 $\pm$ 14.32	46.60 $\pm$ 14.23 ¹⁾	$P<0.01$
西药组	57.90 $\pm$ 14.24	55.53 $\pm$ 13.62	$P<0.01$
中西药联用组	57.67 $\pm$ 14.61	45.73 $\pm$ 12.02 ¹⁾	$P<0.01$
P 值	0.968	0.009	

注：与治疗后西药组相比，¹⁾ $P<0.05$

6.7 远期疗效对比

停药后 3 个月对 90 例患者进行随访, 填写 Gerd Q 量表, 结果见表 15。中药组停药 3 个月后的 Gerd Q 量表总积分与治疗前相比显著降低 ($P<0.01$), 与治疗后相比升高, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$); 西药组停药 3 个月后的 Gerd Q 量表总积分与治疗前相比显著降低 ($P<0.01$), 与治疗后相比显著升高 ($P<0.01$); 中西药联用组停药 3 个月后的 Gerd Q 量表总积分与治疗前相比显著降低 ($P<0.01$), 与治疗后相比升高, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。停药 3 个月后, 中西药联用组 Gerd Q 量表总积分显著低于中药组、西药组 ($P<0.05$, $P<0.01$), 中药组 Gerd Q 量表总积分低于西药组, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 15 停药 3 个月后 Gerd Q 量表总积分比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	治疗前	治疗后	停药 3 个月随访
中药组	13.40 $\pm$ 3.00	8.20 $\pm$ 2.54	9.23 $\pm$ 3.65 ¹⁾
西药组	13.13 $\pm$ 2.79	8.50 $\pm$ 2.40	9.90 $\pm$ 3.23 ^{1) 2)}
中西药联用组	13.37 $\pm$ 2.95	6.90 $\pm$ 2.51	7.17 $\pm$ 2.60 ^{1) 3) 4)}

注: 与治疗前相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与治疗后相比, ²⁾ $P<0.01$; 与中药组相比, ³⁾ $P<0.05$; 与西药组相比, ⁴⁾ $P<0.01$

6.8 安全性评价

三组患者治疗前后的三大常规、肝肾功能、心电图均无明显异常, 且无不良事件的发生。治疗结束后 3 个月进行随访, 未诉特殊不适及异常。

7 讨论

7.1 研究结果

本临床研究将 94 例肝胃郁热型反流性食管炎患者随机分为 3 组, 分别给药, 观察其 Gerd Q 量表评分、中医症状评分、胃镜评分、焦虑量表评分、远期疗效及用药安全性, 进行前后对照, 利用科学分析方法得到以下结论:

①中药组、西药组、中西药联用组的中医症状综合总有效率分别为 93.33%、90.00%、96.67%, 胃镜下炎症改善有效率分别为 86.67%、93.33%、

96.67%，三组用药在中医症状综合总有效率和胃镜下炎症改善有效率方面，没有显著差异。在改善 Gerd Q 量表积分和中医症状总积分方面，中西药联用组疗效优于中药组和西药组，而中药组和西药组疗效相当无明显差异，说明清郁和降汤不仅能有效治疗 RE，还能协同西药提高治疗效果。

②在中医主症改善方面，西药组、中西药联用组对烧心的疗效优于中药组，三组对反酸的疗效相当。在中医次症改善方面，三组对胸骨后疼痛、胃脘灼痛、脘腹胀满、嘈杂易饥的疗效相当；中西药联用组对嗝气的疗效优于中药组、西药组；中药组和中西药联用组对心烦易怒、口干口苦、大便秘结的疗效优于西药组。说明清郁和降汤能更有效的缓解心烦易怒、口干口苦、大便秘结等肝胃郁热表现。

③在焦虑评分的改善方面，中药组和中西药联用组疗效优于西药组，说明对于肝胃郁热型的 RE 患者，清郁和降汤更能有效的缓解焦虑症状。

④在停药 3 个月的随访中，我们发现中药组和中西药联用组对疗效具有更好的保持作用，而西药组停药 3 个月即出现了一定程度症状的反复，这表明清郁和降汤与西药相比有更好的远期疗效。

⑤在治疗的 8 周及随访的 3 个月时间里，3 组患者均未出现不良反应，显示清郁和降汤的安全性良好。

7.2 立方依据

反流性食管炎可归属于中医学“吐酸”、“呃逆”、“胸痹”、“梅核气”、“噎膈”、“胃脘痛”、“痞满”等范畴。病位在食管与胃，与肝、脾等脏腑密切相关，基本病机为胃失和降，浊气上逆。肝属木，主疏泄，喜条达而恶抑郁，具有疏通、畅达全身气机的作用。肝气疏泄调畅气机的作用主要体现在促进脾胃的运化功能、调畅情志、促进血液的运行输布等方面。脾胃属土，主受纳腐熟、运化水谷，脾气以升为健，胃气以降为和；脾胃的运化功能体现在脾胃之气的升降相因、平衡协调。《素问·宝命全形论篇》云：“土需木疏，土得木而达”，肝主疏泄功能正常，是脾胃正常运化的重要条件，可促进脾的升清和胃的降浊，中焦枢机正常运转；

若肝失疏泄，升降无门，会导致中焦升降失常，清气不升，浊气不降。肝气疏泄调畅气机的作用还体现在对人体情志的调节。肝气疏泄功能正常，则气机调畅，气血调和，心情舒畅，情志活动正常；肝气疏泄功能失常，可导致情志活动的异常，而异常的情志刺激也可影响肝的疏泄功能，导致肝气郁结或肝气上逆。“气为血之帅”，气行则血行，气滞则血瘀。肝气疏泄功能正常，则血行畅达无瘀滞，若肝气郁结，则可致血行障碍，血运不畅。肝失疏泄导致胃气不降，可出现腹胀、吐酸、噎气、恶心、呕吐等反流性食管炎的症状；肝失疏泄，肝郁日久化火，可见烦躁易怒等症。由此可见，肝主疏泄功能失常是本病发生的重要病机。《素问玄机原病式·六气为病·吐酸》曰：“酸者，肝木之味，由火盛制金，不能平木，则肝木自甚故为酸也。”《临证备要·吞酸》曰：“胃中泛酸，嘈杂有烧灼感，多因于肝气犯胃。”临床中多见因情志不遂，郁怒伤肝，肝失疏泄，导致肝郁气滞，郁而化热，横逆犯胃，胃失和降，胃气上逆，而发为本病的患者。针对这一病机，导师叶松教授以疏肝清热、和胃降逆为大法，在柴胡疏肝散、左金丸和金铃子散的基础总结出经验方“清郁和降汤”，临床收效颇丰。

有多项研究表明，柴胡疏肝散、左金丸及金铃子散对反流性食管炎有着良好的治疗效果。李影华等^[79]将 98 例肝胃不和型 RE 患者随机分为 2 组，治疗组予以柴胡疏肝散加减治疗，对照组予以雷贝拉唑钠肠溶胶囊治疗，结果治疗组无论是总有效率还是复发率均优于对照组，表明柴胡疏肝散加减治疗 RE 有较好的临床疗效，且明显优于雷贝拉唑钠肠溶胶囊，复发率亦降低，值得临床推广。陈昶洲等^[80]观察柴胡疏肝散颗粒剂联合 PPI 治疗 212 例肝胃郁热型 GERD 患者的临床效果，其中对照组予艾司奥美拉唑镁肠溶片治疗，治疗组在对照组基础上加服柴胡疏肝散颗粒剂，结果显示治疗组效果明显优于对照组，并且停药 4 周后治疗组的 RDQ 评分显著低于对照组，这表明柴胡疏肝散联合 PPI 能显著改善肝胃郁热型 GERD 的症状，疗效明显优于单用 PPI，且能减少停药后的复发。一项基于网络药理

学探讨左金丸治疗反流性食管炎作用机制的研究指出,左金丸主要通过参与调控炎症反应、细胞增殖和凋亡等途径发挥治疗 RE 的作用^[81]。储媛等^[82]运用加味左金丸治疗肝胃郁热型 RE,以雷贝拉唑联合枸橼酸莫沙比利片为对照进行研究,观察到加味左金丸不仅在总有效率方面优于对照组,还能显著降低患者内镜积分及血清血管活性肽、生长抑素水平,提高血清胃泌素、胃动素水平。牛豫洁^[83]招募了 120 例 RE 患者,随机分为两组,治疗组予以加味金铃子散,对照组予以奥美拉唑肠溶片+多潘立酮片,结果显示治疗组在总有效率、食管黏膜破损修复程度方面显著优于西药组。

7.3 组方分析

清郁和降汤是以柴胡疏肝散、左金丸合金铃子散为基础方进行加减而来,由柴胡、枳壳、厚朴、黄连、吴茱萸、^妙莱菔子、陈皮、砂仁、佛手、香椽皮、郁金、延胡索、川楝子、赤白芍、海螵蛸组成。与 2017 年《胃食管反流病中医诊疗专家共识意见》中肝胃郁热证的指导用方相比,本方合用了金铃子散,金铃子散出自《太平圣惠方》,由川楝子、延胡索组成,是治疗肝郁化火诸证的常用方,也是治疗气郁血滞证的基础方。方中川楝子味苦性寒,善入肝经,疏肝气,泻肝火;延胡索辛苦而温,行气活血,长于止痛;两药相配,气行血畅,疼痛自止。同时,加厚朴、莱菔子、砂仁增强中焦气机调理,佛手、香椽皮、郁金疏肝理气解郁,海螵蛸制酸降逆。清郁和降汤的组方体现了导师紧紧围绕肝失疏泄这一病机用药的特点。

在本方中,以柴胡疏肝解郁,条达肝气,鼓舞脾胃清阳上行,用以为君药;枳壳、厚朴、莱菔子行气宽中,与柴胡相配,一升一降,加强中焦气机调理;黄连、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;以上六味共为臣药;陈皮理气健脾和中,砂仁醒脾和胃,二药合用,可健运中州,恢复中焦气机升降;佛手、香椽皮同归肝经、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,取

金铃子散之意，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；海螺蛸制酸敛疮降逆，为治疗胃酸过多之佳品；以上共为佐药；诸药合用，共奏“疏肝清热，和胃降逆”之功。

7.4 组方药物的现代药理学研究

清郁和降汤部分药物现代药理学研究显示：柴胡具有抗抑郁、抗炎、镇痛等药理作用。其中抗炎作用主要依赖柴胡皂苷 a 和 d，它们可以抑制 LPS 活性，减少与炎症相关的前列腺素 E2 (PGE2) 和 NO 的分泌^[84]。柴胡还能够促进肠道蠕动、抑制胃酸分泌及抑制胃蛋白酶的活性，从而降低反流物的攻击作用。还有研究表明，柴胡抗抑郁的作用主要通过柴胡皂苷实现，它调节胆碱能神经系统来控制下丘脑-垂体-肾上腺轴激活，降低皮质醇水平，或是提高 5-羟色胺激素水平^[85]。枳壳具有调节胃肠功能、抗抑郁、抗氧化及抗炎抑菌等药理作用。有研究表明枳壳中的活性成分柠檬烯具有强效的促进胃动力作用，而柚皮苷有较强的加速肠蠕动作用^[86]。枳壳中的柚皮素能够减轻小鼠神经紊乱与抑郁症状，具有抗抑郁药类似的作用^[87]。施学骄等^[88]研究发现同一起来源生长期不同的枳壳、枳实中挥发油均具有一定的抑菌活性，且抑菌效果枳壳>枳实。现代研究发现厚朴的提取物具有改善胃肠运动障碍、抗炎、镇痛、抗病原微生物等作用^[89]。有研究表明，厚朴中的主要成分厚朴苷 A 能通过抑制大鼠延迟肠排空率和提高其抗活性胃泌素、胃动素和降钙素基因相关蛋白的水平，以及降低 5-羟色胺、一氧化氮合酶和血管活性肠肽的水平和肠道微生物群而改善功能性消化不良^[90]。黄连发挥药理作用的主要活性成分为小檗碱。小檗碱可抑制 H-K-ATP 酶活性，抑制胃酸分泌，保护胃黏膜；还可通过抑制炎症因子 IL-1 β ，TNF- α 和 NO 的增加，抑制回肠 TLR4 和 NF- κ B 的活化，减轻 LPS 诱导的肠损伤。小檗碱还具有很强的抗菌功效，对革兰阳性和革兰阴性菌的附着均具有抑制作用，能使菌体表面菌毛数量减少，影响细菌 DNA 的合成^[91]。陈皮的提取液能温和刺激胃平滑肌，促进消化液分泌，排除肠道积气，增加食欲，促进小鼠胃排空和肠推进^[92]。砂仁的对胃肠的保护作用是

通过其挥发油成分对抗胃肠黏膜的攻击因子产生的,其挥发油还对某些菌群有一定的抑制作用^[93];此外,砂仁还具有调节菌群作用,闫瑶等^[94]以 16SrRNA 基因的 PCR-DGGE (PCR-变性梯度凝胶电泳技术),分析服用抗生素前后及服用砂仁调理肠道菌群后发现小鼠肠道菌群结构的多样性和相似性,表明该砂仁对菌群失调小鼠有显著的恢复作用。延胡索的药理作用涉及镇痛、抗焦虑、抗抑郁、抗胃溃疡等多个方面。有研究表明,延胡索的主要物质基础 dl-THP 可以较好的缓解小鼠的焦虑症状,是通过一种用于抗焦虑评估的行为模型高架迷宫来证实的^[95]。LI 等^[96]通过代谢组学的研究方法发现了与大鼠胃溃疡相关的 10 种差异代谢物,而给予延胡索总生物碱后多数代谢物可恢复至正常水平,提示延胡索总生物碱大鼠胃溃疡具有改善作用。

综上所述,清郁和降汤针对肝胃郁热型反流性食管炎而设,能发挥疏肝清热、和胃降逆的功效,经研究证实,其临床疗效肯定,联合西药可进一步提高治疗效果,有效缓解患者症状,改善胃镜情况,改善焦虑状态,远期疗效好,安全性良好,值得在临床进一步推广。

第三部分 实验研究

基因测序技术以及生物信息学的发展,已经彻底改变了我们对健康和疾病中“人类”身体的看法,人体可以看作是与微生物共同构成的“超级生物体”。宿主与微生物之间的关系包含了共存、共生或致病。胃肠道中对宿主有利的共存细菌具有帮助消化,辅助合成维生素,促进肠道免疫系统的发展,以及防止病原体的入侵等作用。这个复杂的微生物群影响着占体内约 10%的代谢物^[97]。而宿主也会提供这部分益生菌适宜的生存环境。为维持这种共生关系,需要免疫系统的平衡,这种微妙的平衡是由微生物间相互作用、胃肠道屏障、黏膜免疫系统所共同维持的,这是正常消化道内环境稳定的先决条件^[98]。细菌和宿主免疫系统之间的相互作用在消化道疾病的发病机制中起着关键作用,包括食管疾病。有许多因素被认为可能会破坏微生物群和宿主之间的微妙平衡,例如年龄、饮食、抗生素和其他药物使用、口腔卫生、吸烟等^[16, 99-103]。这种平衡的打破,可能会导致持续性的微生态失调,导致固有免疫和适应性免疫反应,进而增加炎症的发生和疾病进展的风险^[13]。而有研究证实,细胞因子介导的炎症反应是导致 RE 发生的原因之一,RE 不仅仅是食管黏膜暴露于胃酸、胆汁等腐蚀性物质的结果^[104]。

近年来有一些研究证实食管菌群的变化与 RE 密切相关,革兰氏阴性菌的富集在 RE 食管中起重要作用^[105]。革兰氏阴性菌在反流性食管炎中的含量增加,可以激活 LPS/TLR4/NF- κ B 信号通路诱导食管的炎性反应,对食管黏膜造成损伤。但目前对食管菌群的研究多是相关性研究,药物对于食管菌群影响的研究很少。前期临床研究已证实中药复方清郁和降汤能有效改善 RE 临床症状和食管黏膜损伤,那么清郁和降汤是否会通过调节食管菌群来发挥治疗作用,需要进一步研究。故本实验通建立 RE 大鼠模型,采用 16S rRNA 测序技术对食管菌群进行检测,观察正常食管和 RE 大鼠食

管菌群组成和丰度等方面的差异,并予清郁和降汤进行干预,评估清郁和降汤对食管菌群的影响,并对革兰氏阴性菌外膜的主要结构 LPS 以及调控炎症反应的重要信号通路 TLR4、NF- κ B 及下游的炎症因子等相关指标进行检测,旨在探讨清郁和降汤治疗 RE 的具体作用机制。

实验一 清郁和降汤对反流性食管炎模型大鼠食管菌群的影响

1 实验材料

1.1 试剂

名称	厂家
DNA 提取试剂盒 (D5625-01)	Omega Bio-Tek
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (M0491L)	New England Biolabs
Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (P7589)	Invitrogen
琼脂糖凝胶试剂 (75510-019)	Invitrogen
琼脂糖凝胶电泳缓冲液 (AM9870)	Invitrogen
DL2,000 DNA Marker (3427A)	Takara

1.2 仪器

名称	厂家
PCR 扩增仪 (2720)	Applied Biosystems
酶标仪 (FLX800T)	BioTeK
电泳仪 (DYY-6C)	北京六一生物科技有限公司
凝胶成像系统 (BG-gdsAUTO(130))	北京百晶生物技术有限公司
NanoDrop (NC2000)	Thermo Fisher Scientific
测序平台 (NovaSeq 6000)	Illumina

1.3 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只，体质量（ 180 ± 20 ）g，购买于湖北省实验动物研究中心，许可证号：SCXK（鄂）2020-0018。于湖北中医药大学实验动物中心 SPF 级实验室进行饲养，温度（ 22 ± 3 ）℃，湿度（ 50 ± 5 ）%，自由进食饮水，适应性喂养 1 周后开始实验。本实验严格按照实验动物伦理标准进行操作。

1.4 药物制备

清郁和降汤的药物组成：柴胡、枳壳、厚朴、炒莱菔子、陈皮、砂仁、黄连、吴茱萸、佛手、香橼皮、郁金、延胡索、川楝子、赤芍、白芍、海螵蛸（10：10：10：15：10：6：6：3：10：10：10：10：10：10：10：10），以上中药饮片购自湖北省中医院门诊中药房。清郁和降汤成人每日推荐剂量为 $2.5 \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，根据《中药药理学实验教程（第 2 版）》^[106] 中人与动物间按体表面积折算法，大鼠的每日剂量折算为 $15.8 \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。上述药物经湖北省中医院药剂科煎煮、浓缩、消毒，制备成含生药量 $2 \text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的溶液，4℃ 冰箱储存备用。

雷贝拉唑钠肠溶胶囊（雨田青，珠海润都制药股份有限公司生产，20mg/粒，批准文号：H20110076）；枸橼酸莫沙比利分散片（新络纳，成都康弘药业集团股份有限公司，5mg/片，批准文号：H20031110）；按人与动物间按体表面积折算法计算大鼠用量分别为雷贝拉唑钠肠溶胶囊 $2.1 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、枸橼酸莫沙比利分散片 $1.6 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，每次给药前根据当日所需药量用蒸馏水配成含雷贝拉唑钠肠溶胶囊（ $0.21 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ）和枸橼酸莫沙比利分散片（ $0.16 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ）的混悬液备用。

2 实验方法

2.1 模型制备

60 只 SD 大鼠中随机选取 10 只为假手术组，另外 50 只大鼠采用“前胃结扎+外置幽门部分结扎术”建立 RE 模型，该方法是在“前胃结扎+幽门半结扎术”及“部分贲门肌切开+外置幽门部分结扎术”^[107, 108]基础上加以改良的。具体操作步骤（见图 1）如下：大鼠术前 24h 禁食不禁水，

用 10%水合氯醛腹腔注射进行麻醉,注射计量为 0.3ml/100g。麻醉后备皮,将大鼠仰卧位固定于鼠板上,手术按无菌要求在直视下进行操作;消毒术野皮肤。沿腹中线剖腹进入腹腔,充分游离食管及胃组织,将前胃排空,以 2-0 线结扎前胃。后行幽门部分结扎:将直径 0.38cm 的玻璃棒纵行放置于幽门处外侧与幽门一起结扎,注意避开血管,将玻璃棒抽出后关腹,进行缝合,最后以碘伏对伤口进行消毒,手术结束。假手术组大鼠麻醉后打开腹腔,将胃提出腹腔暴露 10 分钟,然后关闭腹腔。术后 48h 禁食不禁水。

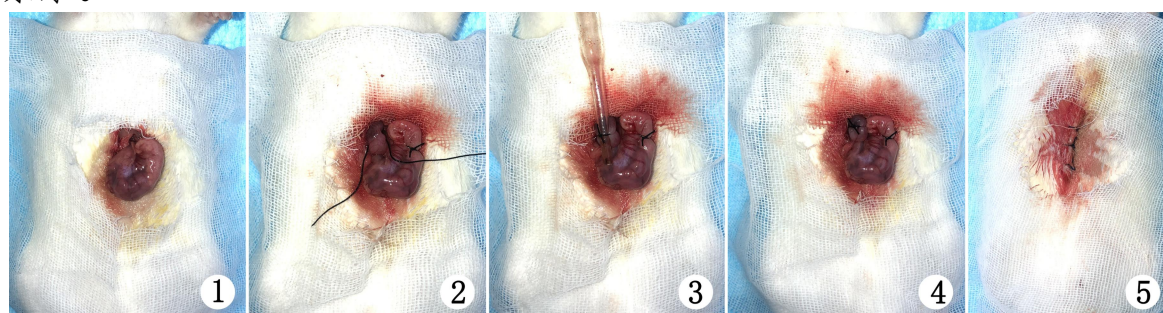


图 1 前胃结扎+外置幽门部分结扎术建立大鼠反流性食管炎模型步骤

2.2 分组及给药

将造模 2 周后成活的 40 只大鼠按随机数字表分成模型组、中药组、西药组和中西药联用组,每组 10 只 ($n=10$)。于术后第 15 天开始,中药组予以清郁和降汤 ($1.58\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) 灌胃,西药组予以雷贝拉唑 ($0.21\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) + 莫沙比利 ($0.16\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) 混悬液灌胃,中西药联用组予以清郁和降汤+西药组混悬液灌胃。假手术组及模型组予蒸馏水灌胃。以上灌胃剂量均为 1ml/100g 大鼠,每日 1 次,连续灌胃 14 天。

2.3 取材

本次实验共进行 2 次取材,第一次取材在术后第 14 天,检测模型是否成功。予超剂量水合氯醛腹腔注射处死大鼠,常规开腹,自贲门处向咽喉部截取食管组织,纵向剖开食管,先肉眼观察食管损伤情况,再将标本置于 4%多聚甲醛中固定。各组大鼠最后一次灌胃结束后,先禁食不禁水 24h。然后进行第二次取材。取材时,大鼠均予 10%水合氯醛腹腔注射 ($0.3\text{ml}/100\text{g}$) 麻醉,将大鼠仰卧固定,用心脏采血法采集大鼠血液 5ml,

室温静置 2h, 3000rpm 离心 15min 分离血清, 取上清液, 置于 EP 管中, -20℃ 冻存待检测。然后常规开腹, 截取食管组织, 先纵向剖开食管, 肉眼观察食管损伤情况。然后将标本分为 3 部分, 1 份置于 4%多聚甲醛中保存; 1 份放入无菌冻存管, 置于-80℃冰箱保存, 用于菌群检测; 1 份放入无菌冻存管, 置于-80℃冰箱保存, 用于 Western blot 检测和 qRT-PCR 检测。取材过程中进行无菌操作, 避免标本污染。

2.4 组织形态学观察

将置于 4%多聚甲醛中保存的食管组织进行常规石蜡包埋, 制备病理切片, HE 染色后, 在光学显微镜下观察大鼠食管黏膜病理形态学表现。

2.5 16S rRNA 扩增子测序检测

首先按照 DNA 提取试剂盒说明进行各组食管样本 DNA 的提取, 然后将提取的菌群总 DNA 进行分子大小判断和定量。选用细菌 16S rRNA 基因高度可变的 V3-V4 区来进行测序。选用上游引物 338F (5' -barcode+ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') , 下游引物 806R (5' -GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') , 进行 PCR 扩增。将扩增的结果进行凝胶电泳, 切取目的片段后进行回收。用酶标仪对 PCR 产物进行定量, 然后按照样本所需的数据量进行混样。接着进行测序文库的构建, 文库检验合格后, 在 Illumina NovaSeq 机器上按照操作说明进行测序。

2.6 数据处理及生物信息学分析 (图 2)

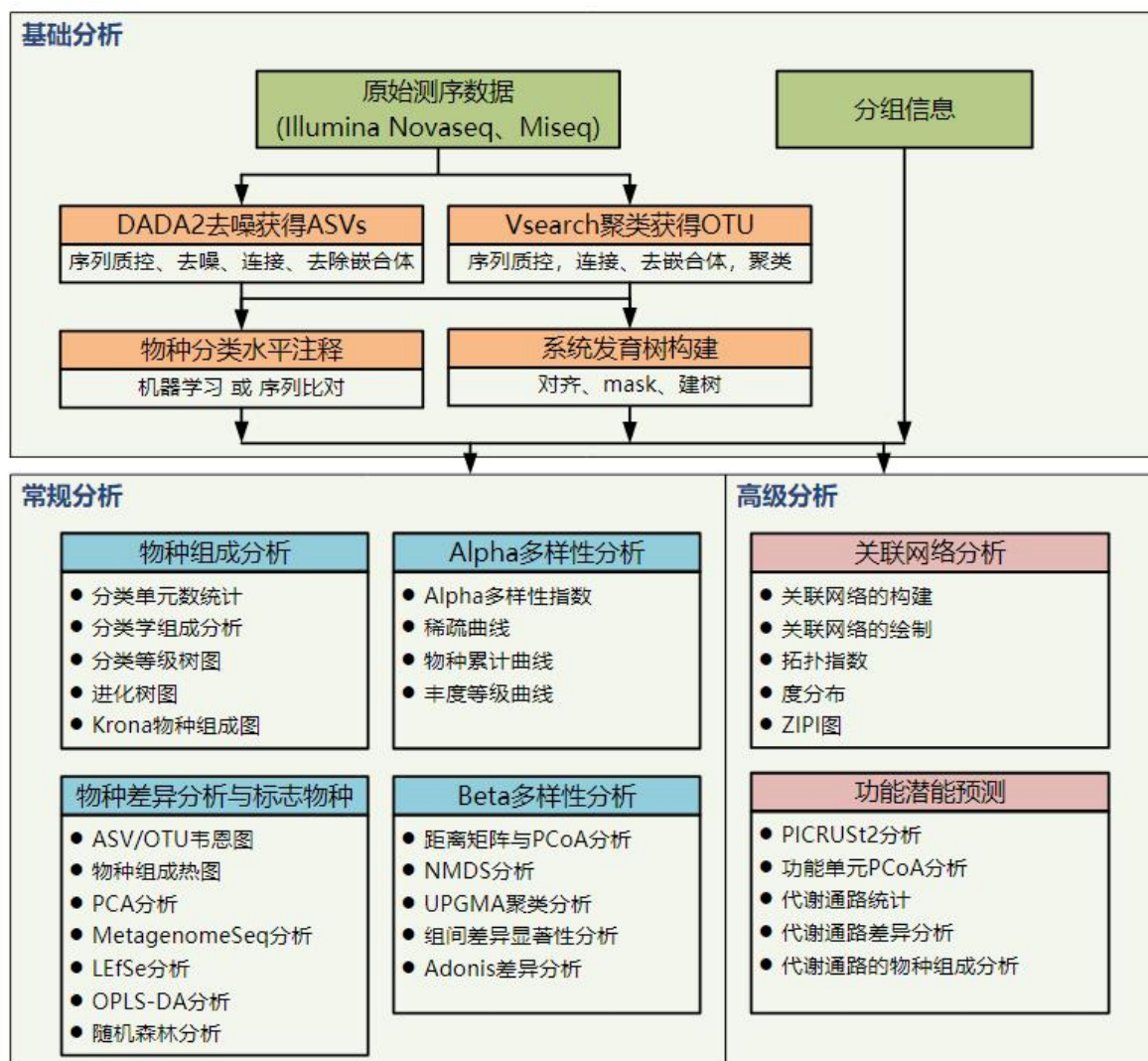


图 2 大鼠食管菌群 16S rRNA 测序生信分析流程图

2.6.1 测序数据预处理

按照 QIIME2 DADA2 分析流程进行序列处理，首先切除序列的引物片段，弃去未匹配引物的序列；然后调用 DADA2 进行质控、去噪、拼接、去嵌合体。使用 DADA2 质控后产生的每个去重的序列称为 ASVs (amplicon sequence variants)，或称为特征序列。

2.6.2 物种组成分析

对抽平后的 ASV 表格进行统计，可以获得每个样本中的微生物群落在域 (domain)、门 (phylum)、纲 (class)、目 (order)、科 (family)、属 (genus)、种 (species) 不同分类水平的具体组成表。对去除 singleton

(在全体样本中,序列总数仅为 1 的 ASV)后的特征表进行统计,在 QIIME2 软件平台上调用相关命令进行绘图,可以柱状图的形式实现各个样本在物种门、纲、目、科、属、种水平上组成分布的可视化。

2.6.3 Alpha (α) 多样性分析

alpha 多样性聚焦于单个样本或单个实验组的物种多样性分析,主要用于评价物种的丰富度、多样性、均匀度和覆盖度等。alpha 多样性指数中,Chao1 指数和 Observed species 指数揭示物种的丰富度,也就是物种的有无,Shannon 指数和 Simpson 指数揭示物种的多样性,同时考虑物种的有无和物种的数量。这 4 个指数值越大,说明所检测样本的微生物多样性越高。稀疏曲线可以揭示样本 alpha 多样性随抽平深度的变化趋势,曲线越平缓,说明样本的 alpha 多样性已经饱和,测序深度足够,继续增加测序深度已经无法检测到新的物种;曲线越陡,则表示样本的 alpha 多样性还未接近饱和,还有新的物种没有被发现。

2.6.4 Beta (β) 多样性分析

Beta 多样性聚焦于不同样本之间或者不同组别之间的物种多样性差异。常用的 beta 多样性距离有 Jaccard 距离,Bray-Curtis 距离,unweighted UniFrac 距离和 weighted UniFrac 距离。基于以上距离矩阵算法,可通过主坐标分析(Principal coordinate analysis, PCoA)对多维的微生物数据进行降维,并通过对样本在连续排序轴的分布,展示数据变化的主要趋势,实现数据可视化分析。

同时,采用 Anosim 分析对不同组间样本的 beta 多样性是否具有显著差异进行统计学检验。Anosim 结果是通过 R 值来解释组间差异的,当 R 值小于 0 时表示组内的差异大于组间的差异,大于 0 时表示组间的差异大于组内的差异, $P < 0.05$ 为检验具有统计学意义。

2.6.5 物种差异及标志物种分析

组间物种差异分析主要采用 LEfSe (LDA Effect Size) 分析,该分析是将非参数的 Kruskal-Wallis 以及 Wilcoxon 秩和检验,与线性判别分

析 (Linear discriminant analysis, LDA) 效应量 (Effect size) 相结合的分析手段, 可以直接对所有分类水平同时进行差异分析, 同时寻找分组之间稳健的差异物种, 即标志物种 (biomarker)。

2.7 统计学方法

食管菌群的检测数据使用测序公司的云平台 (www.genescloud.cn) 进行分析。

3. 实验结果

3.1 一般情况

实验从造模开始到结束灌胃共持续 28 天。假手术组 10 只大鼠全部存活, 造模组在术后第 14 天取材 2 只验证造模是否成功, 余下存活 40 只。大鼠死亡原因可能与幽门梗阻、肠梗阻、腹腔感染和窒息等有关。假手术组大鼠毛发色泽光鲜、较少脱落, 活动敏捷, 食量较多, 大便成形, 体重逐步增加; 造模期间, 除假手术组外的各组大鼠均有不同程度的毛发色泽变暗及脱落, 活动减少, 喜扎堆, 进食饮水量减少, 便溏, 体重减轻等表现, 部分大鼠还出现打嗝、嘴边可见反流物流出等表现; 灌胃期间, 中药组、西药组及中西药联用组上述症状逐渐恢复, 其中中西药联用组恢复最快, 而模型组恢复最慢。

3.2 模型评价

在术后第 14 天, 随机选择 2 只 RE 模型大鼠进行食管取材, HE 染色后观察食管病理改变, 以确定造模是否成功。结果显示: 食管鳞状上皮增厚并伴有基底细胞增生, 部分可见鳞状上皮缺失, 黏膜固有层乳头延伸, 可见大量炎性细胞浸润, 见图 3。根据食管病理结果可知, 已造模成功。

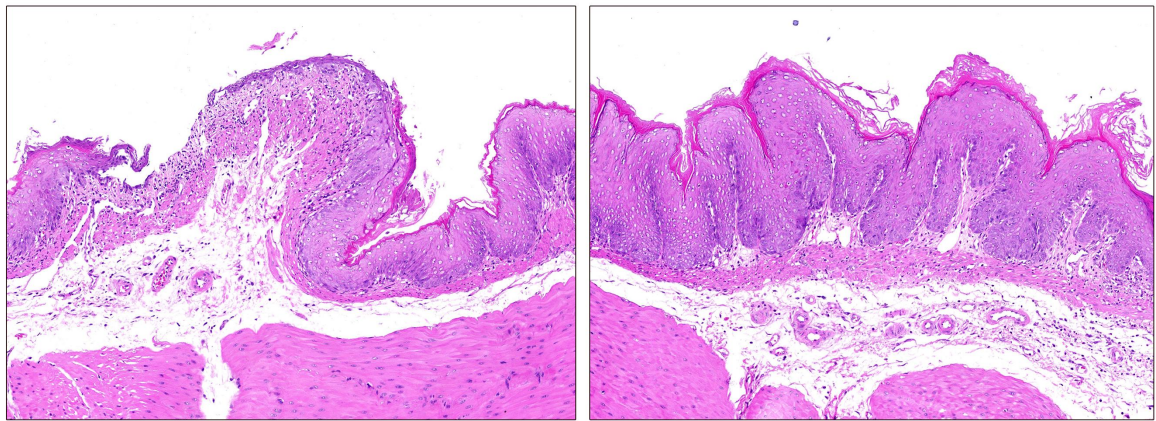


图 3 大鼠食管病理表现（HE，×100）

3.3 16S rRNA 测序结果

3.3.1 序列处理

本次共检测 41 个样本（假手术组 9 个、模型组 6 个、中药组 8 个、西药组 9 个、中西药联用组 9 个，剔除了取材过程中可能被污染影响菌群检测结果的样本），经过滤、去噪、拼接和去嵌合体后总共产生了 2735928 个序列，平均每个假手术组样本 65255 个序列，每个模型组样本 74749 个序列，每个中药组样本 74599 个序列，每个西药组样本 61713 个序列，每个中西药联用组样本 60881 个序列。所有样本序列平均长度为 400bp。见图 4。

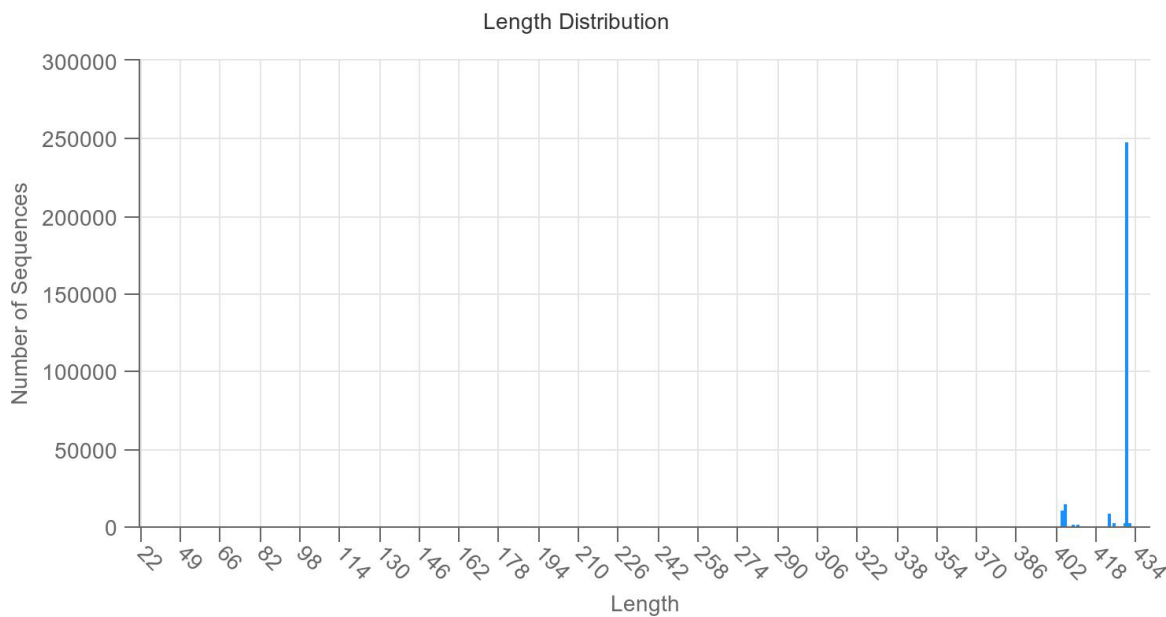
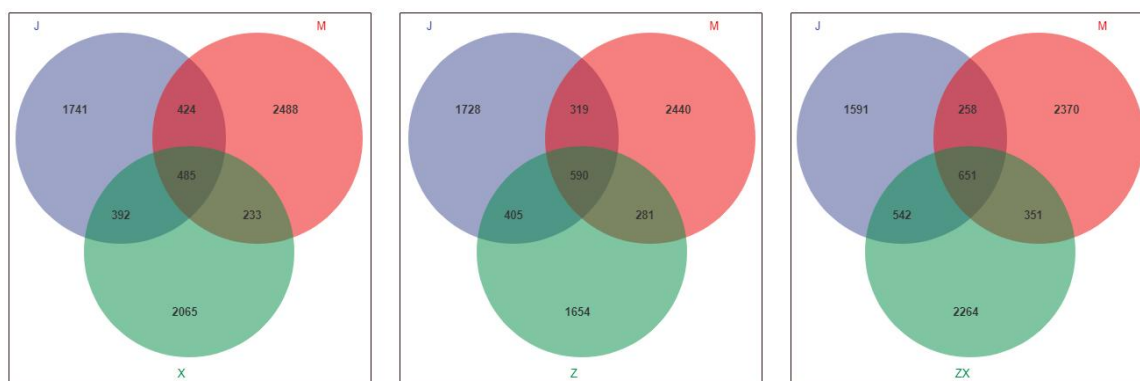


图 4 序列长度分布图

3.3.2 各组 ASV 韦恩图分析

采用韦恩图分析比较各组之间食管中物种分布的相似性及特异性。见图 5。

在假手术组、模型组、西药组、中药组、中西药联用组分别鉴定出 ASV 3042 个、3630 个、3175 个、2930 个、3808 个。其中假手术组与模型组共有 ASV 序列 909 个，假手术组与西药组、中药组、中西药联用组之间共有的序列分别为 877 个、995 个、1193 个。西药组、中药组、中西药联用组相对模型组的特异 ASV 序列分别为 2457 个、2059 个、2806 个，与模型组特异共有的 ASV 序列分别为 233 个、281 个、351 个，与假手术组特异共有的 ASV 序列为 392 个、405 个、542 个。提示治疗后各组大鼠的食管菌群结构发生改变，而三个治疗组与假手术组特异共有的 ASV 个数多于模型组，说明三个治疗组菌群相似度均倾向于假手术组，其中中西药联用组与假手术组重合的 ASV 数最多，变化更趋向于假手术组。



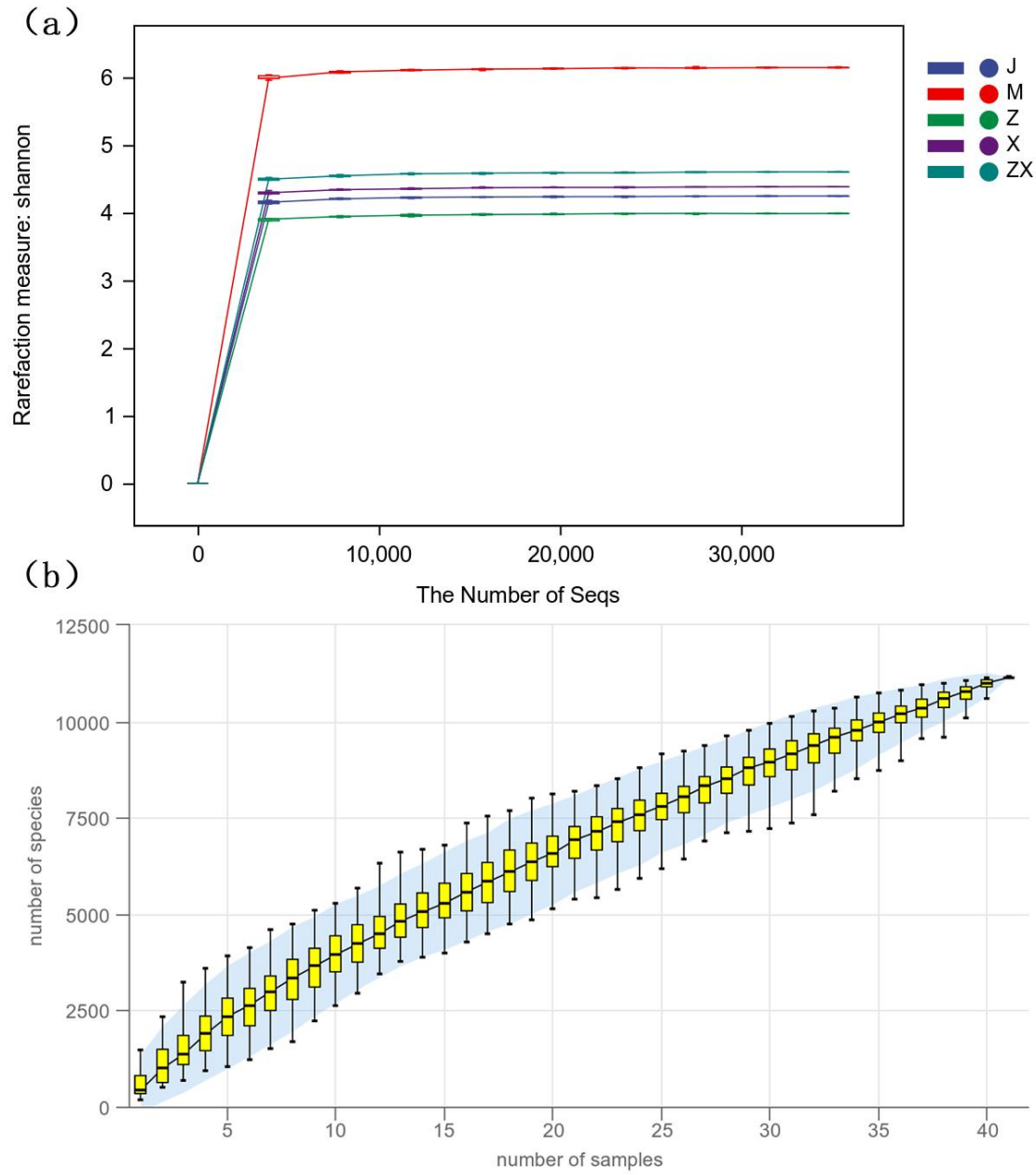
注：J. 假手术组；M. 模型组；Z. 中药组；X. 西药组；ZX. 中西药联用组（下同）

图 5 各组大鼠食管菌群 ASV 韦恩图分析

3.3.3 食管菌群 α 多样性分析

3.3.3.1 α 多样性曲线分析

以稀松曲线、物种累积曲线显示测序深度。由图 6 可知，稀松曲线分布平缓，物种累积曲线分布也逐渐趋于平缓，表明各样本的测序深度已足够，各组样本的所有物种都基本检测到了。



注：（a）稀疏曲线；（b）物种累积曲线

图 6 各组大鼠食管菌群稀疏曲线、物种累积曲线

3.3.3.2 α 多样性指数分析

Chao1 指数和 Observed species 指数揭示物种的丰富度, Shannon 指数和 Simpson 指数揭示物种的多样性。如图 7 可知, 各组在 Chao1 指数、Observed species 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数上差异无统计学意义 ($P>0.05$), 提示各组样本的物种丰富度和多样性没有显著差异。

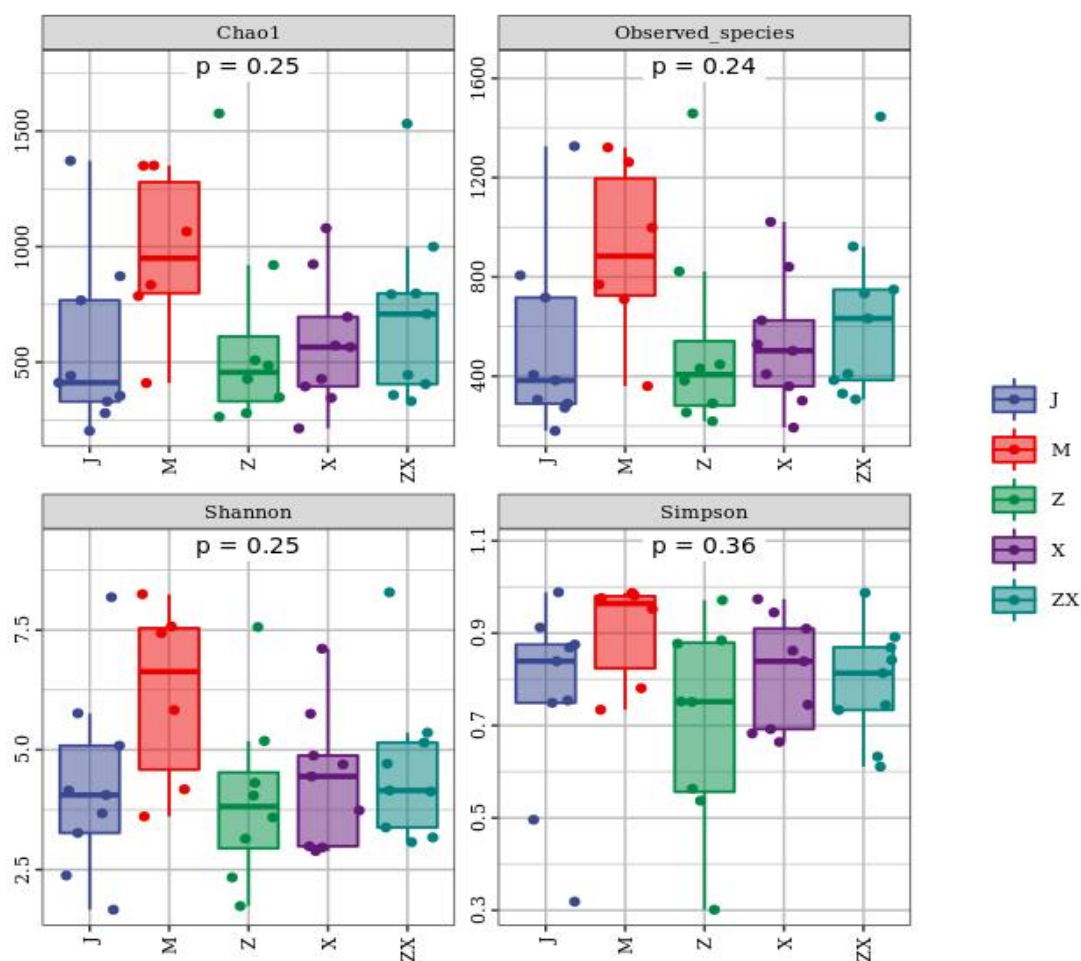


图 7 各组大鼠食管菌群的 α 多样性指数比较

3.3.4 食管菌群 β 多样性分析

本研究采用 PCoA 分析各组大鼠食管菌群的组间差异性, 并采用 Anosim 方法检验组间差异的显著性。图中的点代表样本, 颜色代表相应分组。两点在坐标轴上的投影距离越近, 则说明这两个样本在相应维度中的菌群组成越相似。

如图 8 所示, PCoA 结果显示, 第一主成分 PCoA1 可以解释组间 28.4% 的差异, 第二主成分 PCoA2 可以解释组间 13.9% 的差异。假手术组和模型组菌群分布在不同区域, 明显分开; 西药组、中药组、中西药联用组食管菌群分布与假手术组和模型组都有重叠, 但这三个组均与假手术组的重叠范围更大, 距离更靠近假手术组, 说明西药组、中药组、中西药联用组的食管菌群分布与假手术组更为接近。见图 8。

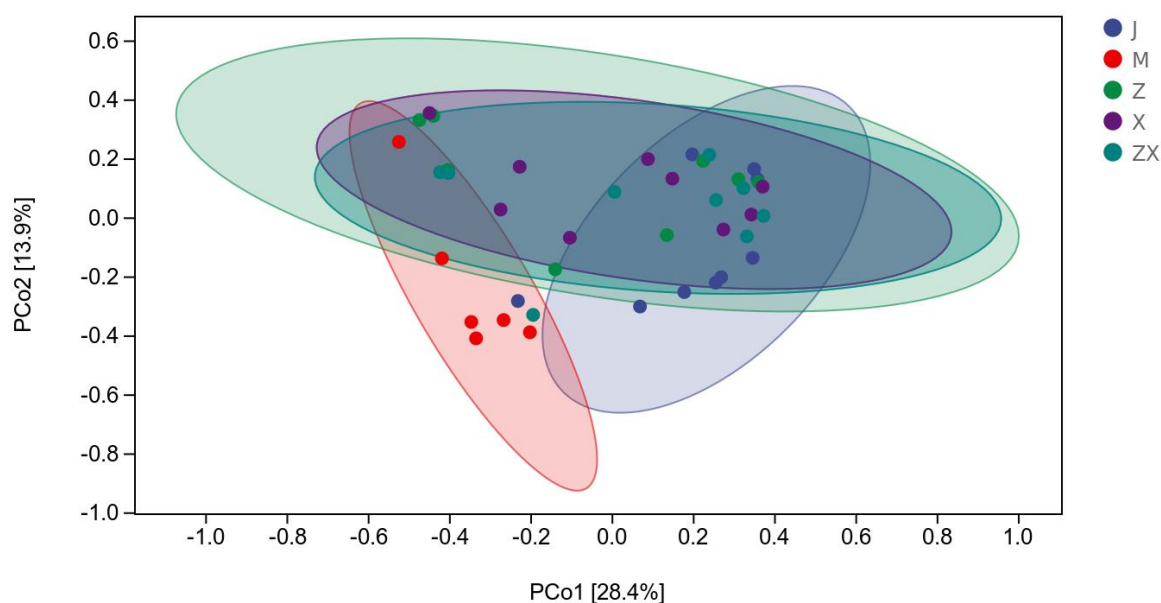
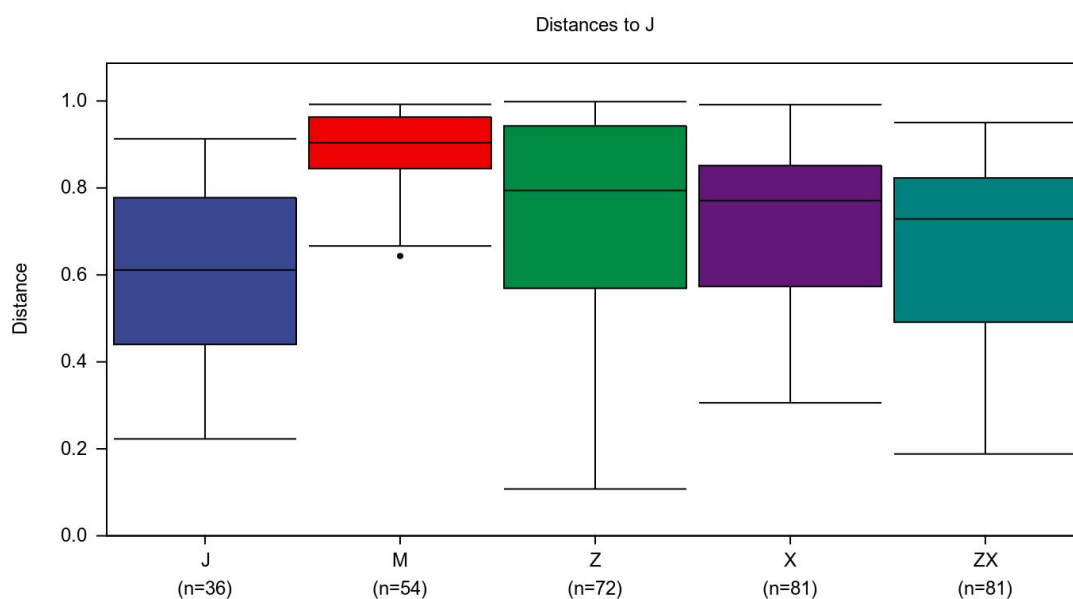


图 8 各组大鼠食管菌群的 PCoA 分析

同时进行组间差异分析, 采用 Anosim 方法, 结果显示, 5 组间总体比较 R 值为 0.23, $P < 0.05$, 说明组间菌群组成是有差异的。其中, 假手术组与模型组比较, R 值为 0.79, 校正后 $P < 0.01$, 两组间菌群组成差异显著大于组内; 假手术组与西药组比较, R 值为 0.22, 校正后 $P < 0.05$, 两组间菌群组成差异显著大于组内; 假手术组与中药组、中西药联用组比较, R 值分别为 0.17、0.08, 校正后 $P > 0.05$, 差异无统计学意义; 与模型组相比, 西药组、中药组、中西药联用组 R 值分别为 0.60、0.41、0.64, 校正后 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 说明三个治疗组菌群组成与模型组的差异均显著大于组内; 中药组、西药组、中西药联用组间两两比较差异无统计学

意义 ($P>0.05$)，表明这三组间菌群组成差异与组内差异不明显。见图 9、表 1。



注：该图展示了假手术组内样本间距离的分布箱线图以及假手术组样本与其余各组的样本间距离的箱线图。纵坐标表示距离，横坐标内 n 表示比较的次数。

图 9 各组大鼠食管菌群的组间差异分析

表 1 Anosim 结果分析

Group1	Group2	Samplesize	Permutations	R	P value	Q value
all	-	41	999	0.231709	0.001	-
J	M	15	999	0.793028	0.001	0.005
J	Z	17	999	0.171875	0.034	0.056666667
J	X	18	999	0.219136	0.016	0.032
J	ZX	18	999	0.078875	0.105	0.15
M	Z	14	999	0.406008	0.004	0.01
M	X	15	999	0.599855	0.001	0.005
M	ZX	15	999	0.63907	0.002	0.006666667
Z	X	17	999	0.000868	0.406	0.451111111
Z	ZX	17	999	-0.003472	0.378	0.451111111
X	ZX	18	999	-0.054184	0.771	0.771

3.3.5 物种分类学分析

根据 ASV 在不同物种分类学水平上的注释结果,以柱状图的形式展示各组物种的相对丰度及其变化情况。图中不同的颜色表示不同的物种,色块的长度表示该物种所占相对丰度的比例。

3.3.5.1 门 (Phylum) 水平各组大鼠食管菌群物种组成分布

以柱状图的形式展示丰度水平前十的物种,其余物种合并为 others,图 10 所示为门水平下各组大鼠食管菌群物种组成柱状图。

结果显示:厚壁菌门是各组的主要优势菌群。厚壁菌门在各组中的相对丰度排列依次为西药组、中西药联用组、中药组、假手术组、模型组(90.05%、83.14%、82.50%、74.60%、53.35%);变形菌门在各组中的相对丰度排列依次为模型组、假手术组、中药组、中西药联用组、西药组(19.51%、10.99%、5.16%、3.55%、1.00%);放线菌门在各组中的相对丰度排列依次为模型组、西药组、中药组、中西药联用组、假手术组(9.70%、4.55%、2.95%、2.01%、1.24%)。拟杆菌门在各组中的相对丰度排列依次为模型组、西药组、中西药联用组、假手术组、中药组(3.00%、1.54%、1.26%、0.43%、0.31%)。在假手术组中,厚壁菌门相对丰度最高,而模型组厚壁菌门相对丰度较假手术组明显降低,经药物干预后,三个治疗组厚壁菌门相对丰度较模型组明显增加;模型组中变形菌门、放线菌门相对丰度较假手术组明显增加,经药物干预后,三个治疗组变形菌门、放线菌门相对丰度较模型组降低。

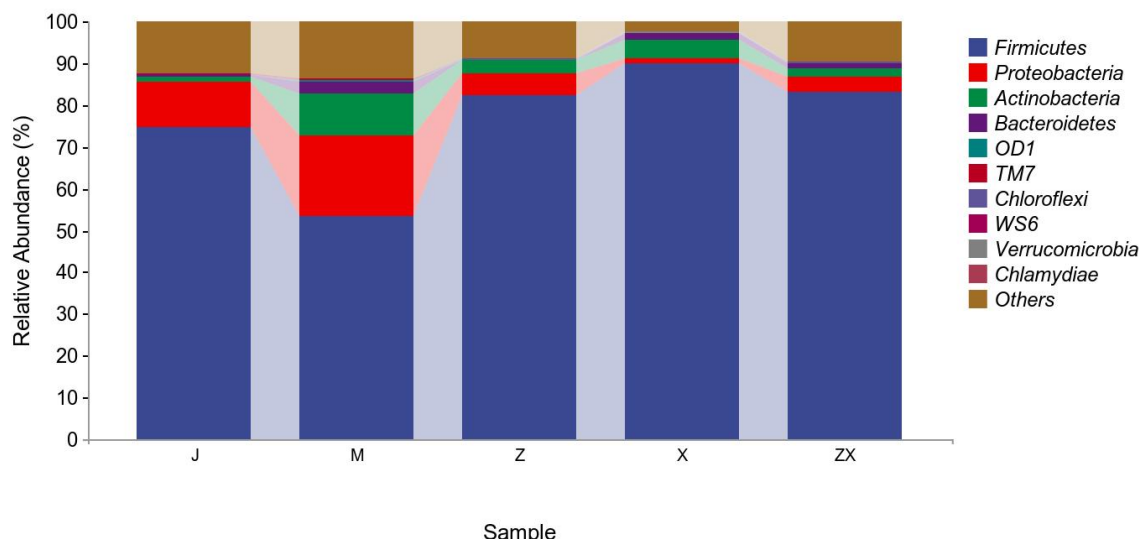


图 10 门水平各组大鼠食管菌群的 相对丰度

3.3.5.2 科 (Family) 水平各组大鼠食管菌群物种组成分布

图 11 所示为科水平下各组大鼠食管菌群物种组成柱状图。

结果显示：乳杆菌科是各组主要优势菌群。乳杆菌科在各组中的相对丰度排列依次为中药组、中西药联用组、西药组、假手术组、模型组（70.24%、63.51%、63.41%、49.83%、18.85%）；链球菌科各组中的相对丰度排列依次为假手术组、西药组、中西药联用组、模型组、中药组（21.56%、15.59%、13.89%、6.89%、4.80%）。可见，在假手术组中乳杆菌科相对丰度最高，而模型组乳杆菌科相对丰度较空白组明显降低，经药物干预后，三个治疗组乳杆菌科相对丰度较模型组均明显增加；链球菌科在假手术组中也占优势，而模型组链球菌科相对丰度较空白组明显降低，经药物干预后，西药组、中西药联用组链球菌科相对丰度较模型组明显增加。

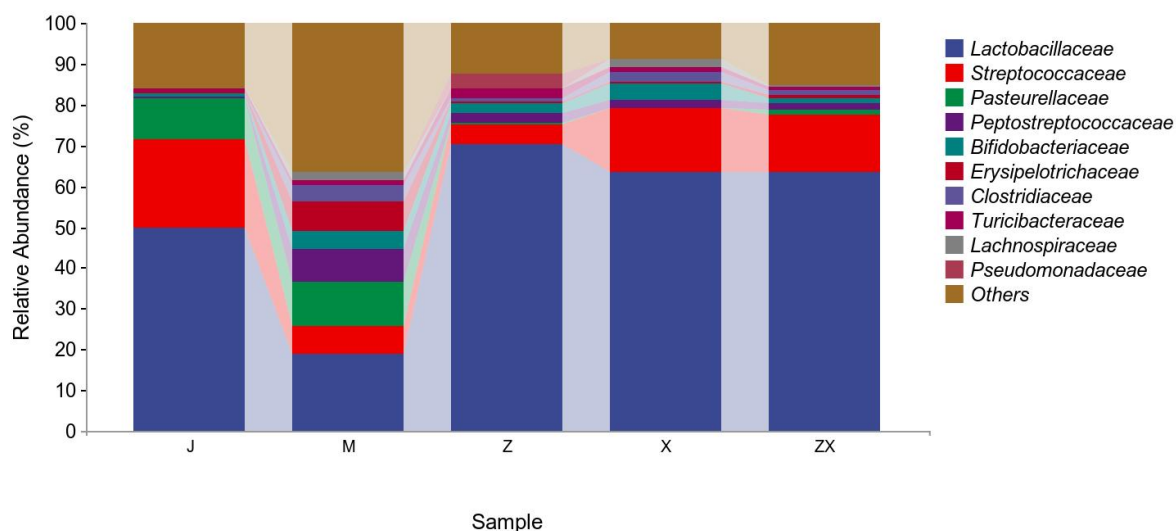


图 11 科水平各组大鼠食管菌群的 相对丰度

3.3.5.3 属 (Genus) 水平各组大鼠食管菌群物种组成分布

图 12 所示为属水平下各组大鼠食管菌群物种组成柱状图。

结果显示：乳杆菌属是各组主要优势菌群。乳杆菌属在各组中的相对丰度排列依次为中药组、中西药联用组、西药组、假手术组、模型组（70.20%、63.43%、63.33%、49.80%、18.34%）；链球菌属在各组中的相对丰度排列依次为假手术组、西药组、中西药联用组、模型组、中药组（21.08%、15.11%、13.25%、6.86%、4.58%）。可见，在假手术组中乳杆菌属相对丰度最高，而模型组乳杆菌属相对丰度较假手术组明显降低，经药物干预后，三个治疗组乳杆菌属相对丰度较模型组均明显增加；链球菌属在假手术组中也占优势，而模型组链球菌属相对丰度较假手术组明显降低，经药物干预后，西药组、中西药联用组链球菌属相对丰度较模型组明显增加。

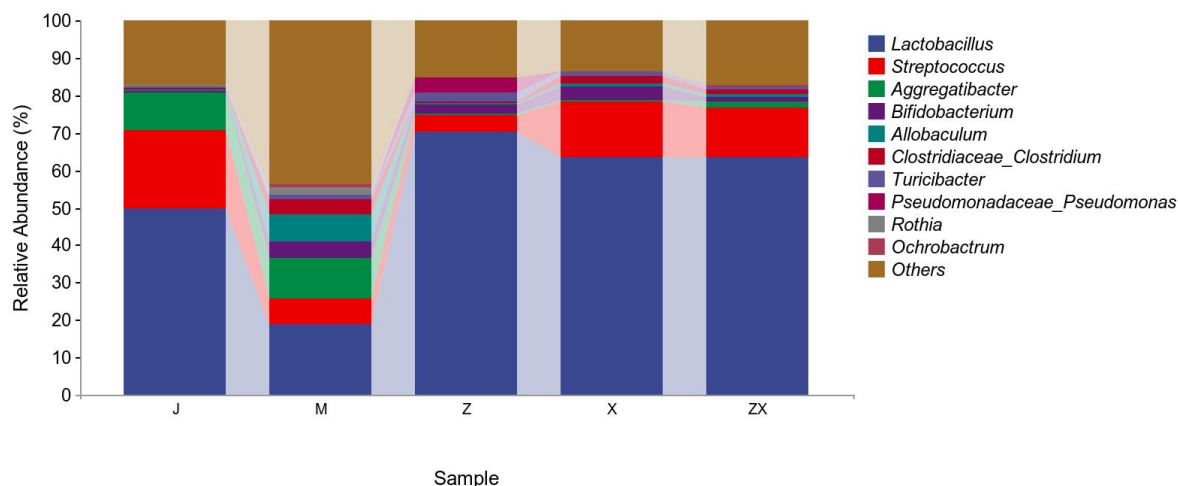


图 12 属水平各组大鼠食管菌群的相对丰度

3.3.6 大鼠食管菌群组间差异性分析

3.3.6.1 属水平下物种热图分析

通过物种聚类绘制热图，能很清楚的看到差异物种在各组中的分布情况，在此使用平均丰度前 20 位的属的丰度数据绘制热图。在图 13 中，墨绿色代表样本中丰度较高的属，棕色代表丰度较低的属。对于模型组，属水平丰度较高的物种有脱硫弧菌属（*Desulfovibrio*）、梭菌属（*Clostridium*）、不动杆菌属（*Acinetobacter*）、普氏菌属（*Prauserella*）、拟杆菌属（*Bacteroides*）、罗斯氏菌属（*Rothia*）、阿洛巴氏菌属（*Allobaculum*）、涅斯捷连科氏菌属（*Nesterenkonia*）、苍白杆菌属（*Ochrobactrum*）等。总的来说，假手术组和中药组、西药组和中西药联用组菌群组成是相似的，模型组的菌群组成与其他 3 组有明显的差异。

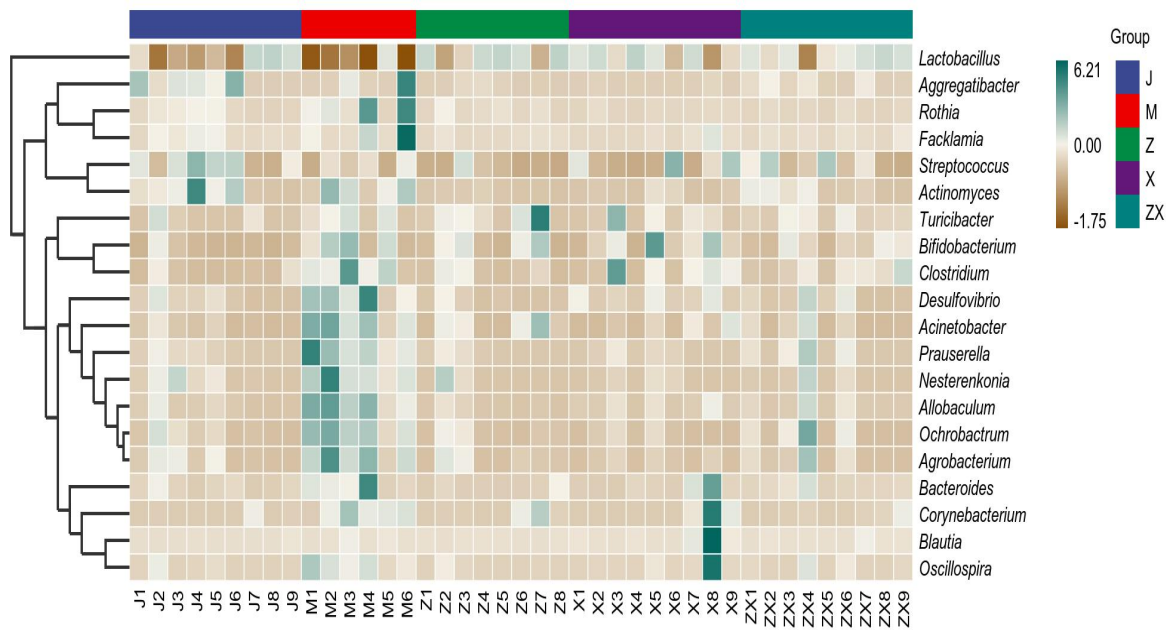


图 13 属水平下群落组成分布热图

3.3.6.2 大鼠食管菌群 LEfSe 分析

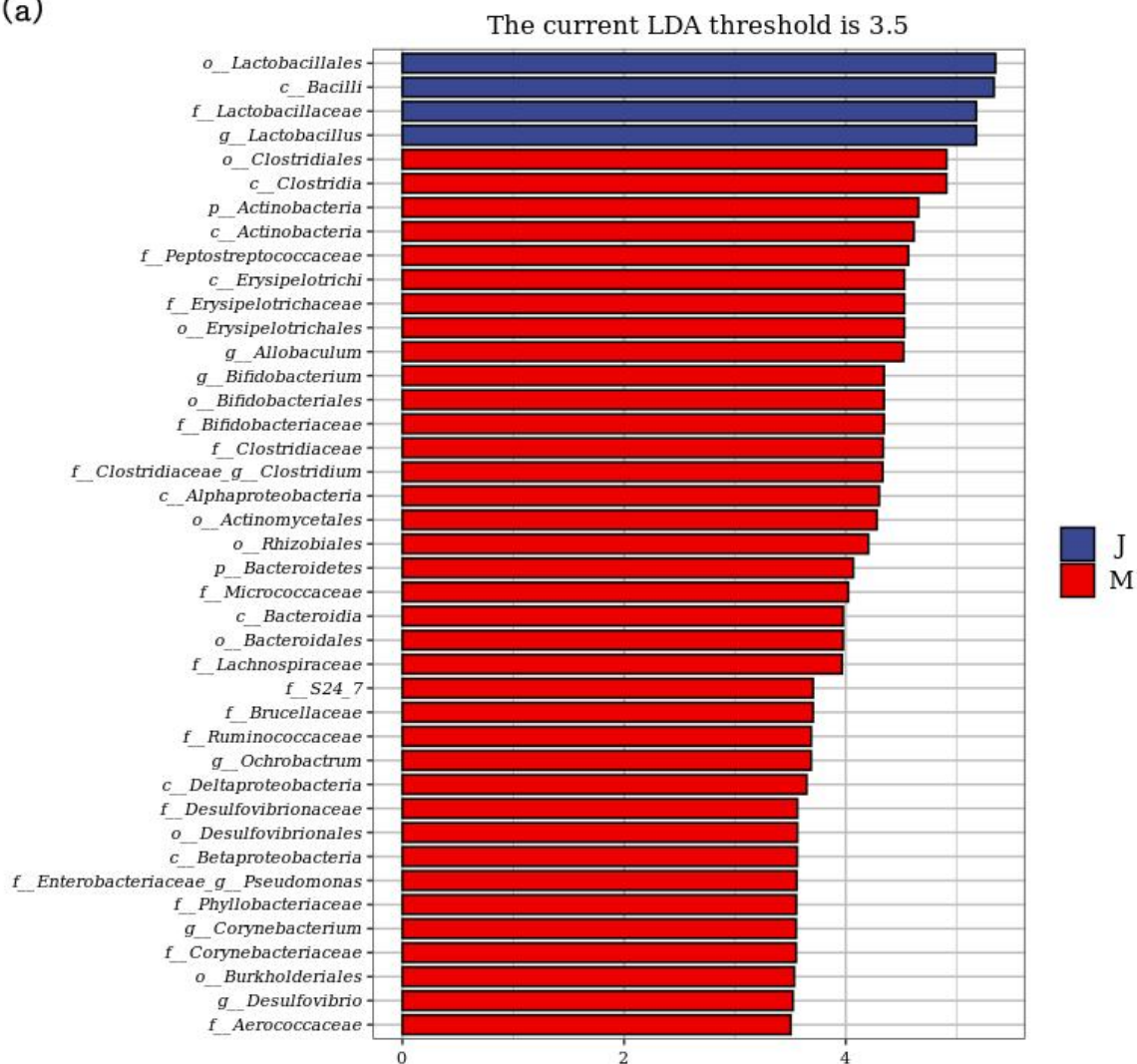
本研究采用 LEfSe 分析各组大鼠起主要作用的特征性物种，分析结果以 LDA 值柱状图和分类学分支图展示。柱状图中以条形柱的长度代表 LDA 值，反映该物种对组间差异影响力的大小。分类学分枝图从内圈到外圈展示了样本群落中从门到属主要分类单元的分类等级关系。节点的大小和相对丰度呈正比；空心节点表示组间无显著差异的分类单元，而红色和蓝色节点表示组间有显著差异的分类单元；字母标注了组间存在显著差异的分类单元的名称。

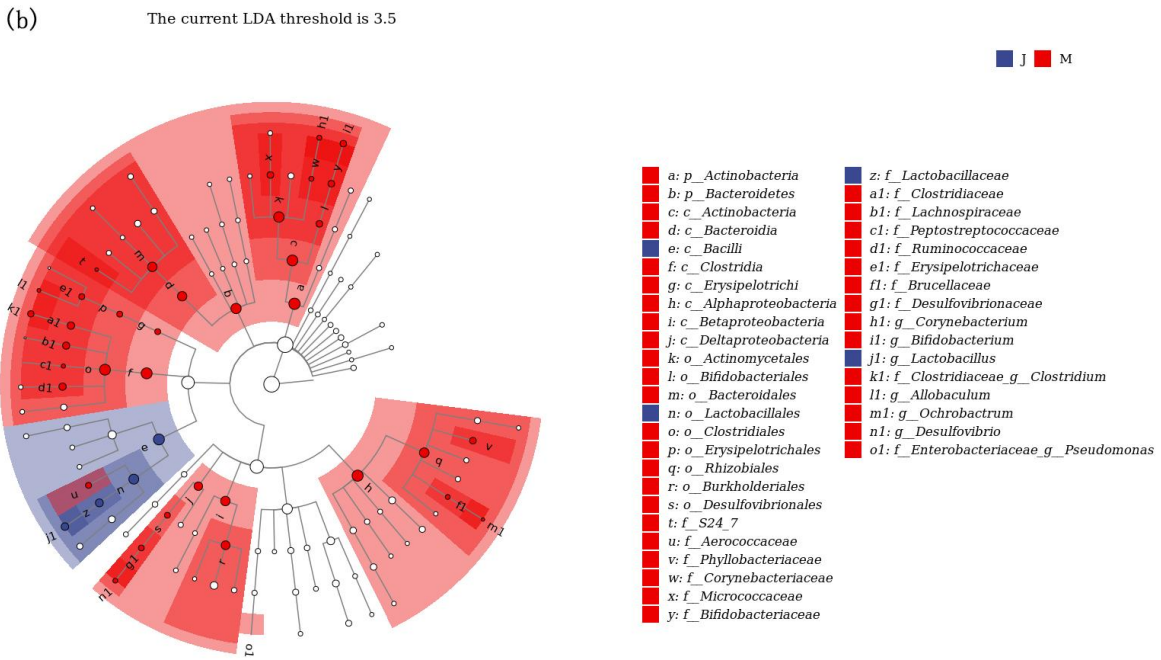
①假手术组与模型组间差异物种分析

图 14 为假手术组与模型组间差异物种分析结果。结果显示：在门水平下，放线菌门（Actinobacteria）、拟杆菌门（Bacteroidetes）在模型组丰度较高，与假手术组相比有显著差异（ $P<0.05$ ）。在属水平下，棒状杆菌属（Corynebacterium）、双歧杆菌属（Bifidobacterium）、梭菌属（Clostridium）、阿洛巴氏菌属（Allobaculum）、假单胞菌属（Pseudomonas）、苍白杆菌属（Ochrobactrum）、脱硫弧菌属（Desulfovibrio）在模型组中丰度较高，与假手术组相比有显著差异（ P

<0.05)；乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 在假手术中丰度较高，与模型组相比有显著差异 ($P<0.05$)。

(a)





注：（a）LDA 值分布柱状图；（b）分类学分支图（下同）

图 14 假手术组与模型组大鼠食管菌群 LEfSe 分析

②西药组与模型组间差异物种分析

图 15 为西药组与模型组间差异物种分析结果。在门水平下，放线菌门 (Actinobacteria)、变形菌门 (Proteobacteria) 在模型组丰度较高，与西药组相比有显著差异 ($P<0.05$)；厚壁菌门 (Firmicutes) 在西药组丰度较高，与模型组相比有显著差异 ($P<0.05$)。在属水平下，罗斯氏菌属 (Rothia)、阿洛巴氏菌属 (Allobaculum)、苍白杆菌属 (Ochrobactrum)、脱硫弧菌属 (Desulfovibrio) 在模型组中丰度较高，与西药组相比有显著差异 ($P<0.05$)；乳杆菌属 (Lactobacillus) 在西药组中丰度较高，与模型组相比有显著差异 ($P<0.05$)。

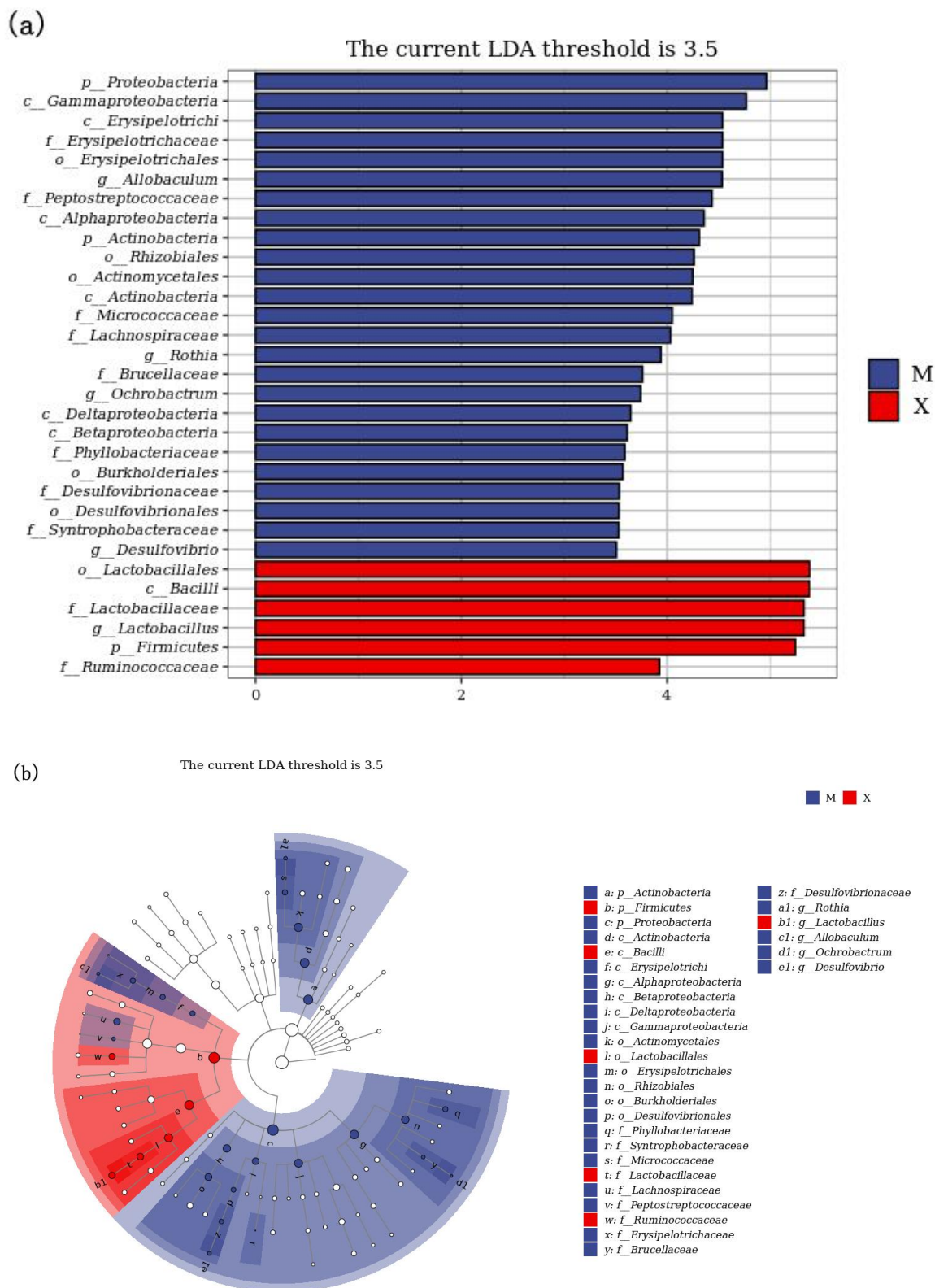
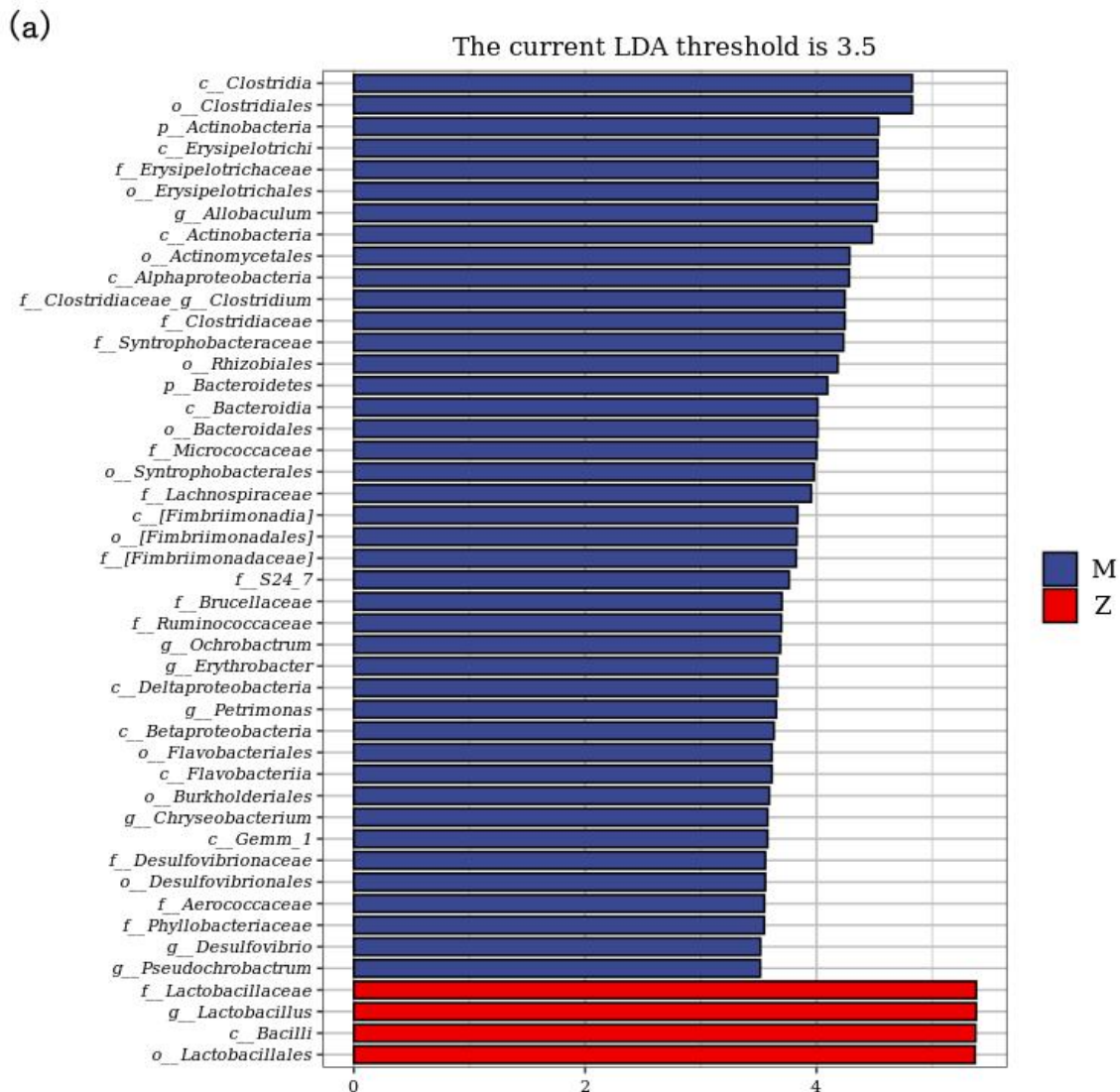


图 15 西药组与模型组大鼠食管菌群 LefSe 分析

③ 中药组与模型组间差异物种分析

图 16 为中药组与模型组间差异物种分析结果。结果显示：在门水平下，放线菌门（Actinobacteria）、拟杆菌门（Bacteroides）在模型组丰度较高，与中药组相比有显著差异（ $P<0.05$ ）。在属水平下，金黄杆菌属（Chryseobacterium）、梭菌属（Clostridium）、阿洛巴氏菌属（Allobaculum）、苍白杆菌属（Ochrobactrum）、假苍白杆菌属（Pseudochrobactrum）、脱硫弧菌属（Desulfovibrio）在模型组中丰度较高，与中药组相比有显著差异（ $P<0.05$ ）；乳杆菌属（Lactobacillus）在中药组中丰度较高，与模型组相比有显著差异（ $P<0.05$ ）。



(b)

The current LDA threshold is 3.5

■ M ■ Z

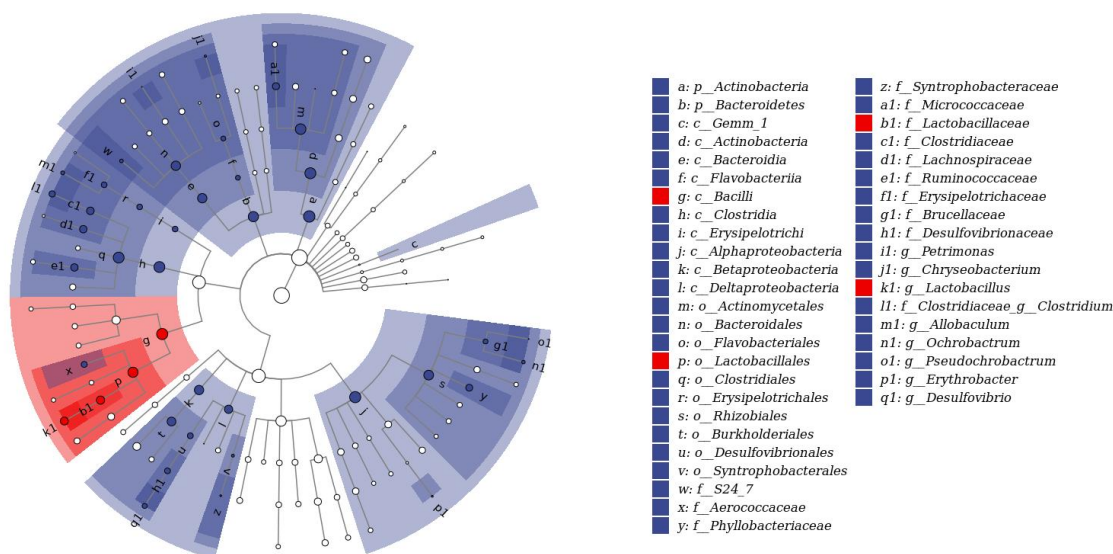


图 16 中药组与模型组大鼠食管菌群 LEfSe 分析

④中西药联用组与模型组间差异物种分析

图 17 为中西药联用组与模型组间差异物种分析结果。结果显示：在门水平下，放线菌门（Actinobacteria）在模型组丰度较高，与中西药联用组相比有显著差异（ $P < 0.05$ ）。在属水平下，罗斯氏菌属（Rothia）、双歧杆菌属（Bifidobacterium）、梭菌属（Clostridium）、阿洛巴氏菌属（Allobaculum）、苍白杆菌属（Ochrobactrum）、脱硫弧菌属（Desulfovibrio）在模型组中丰度较高，与中西药联用组相比有显著差异（ $P < 0.05$ ）；乳杆菌属（Lactobacillus）在中西药联用组中丰度较高，与模型组相比有显著差异（ $P < 0.05$ ）。

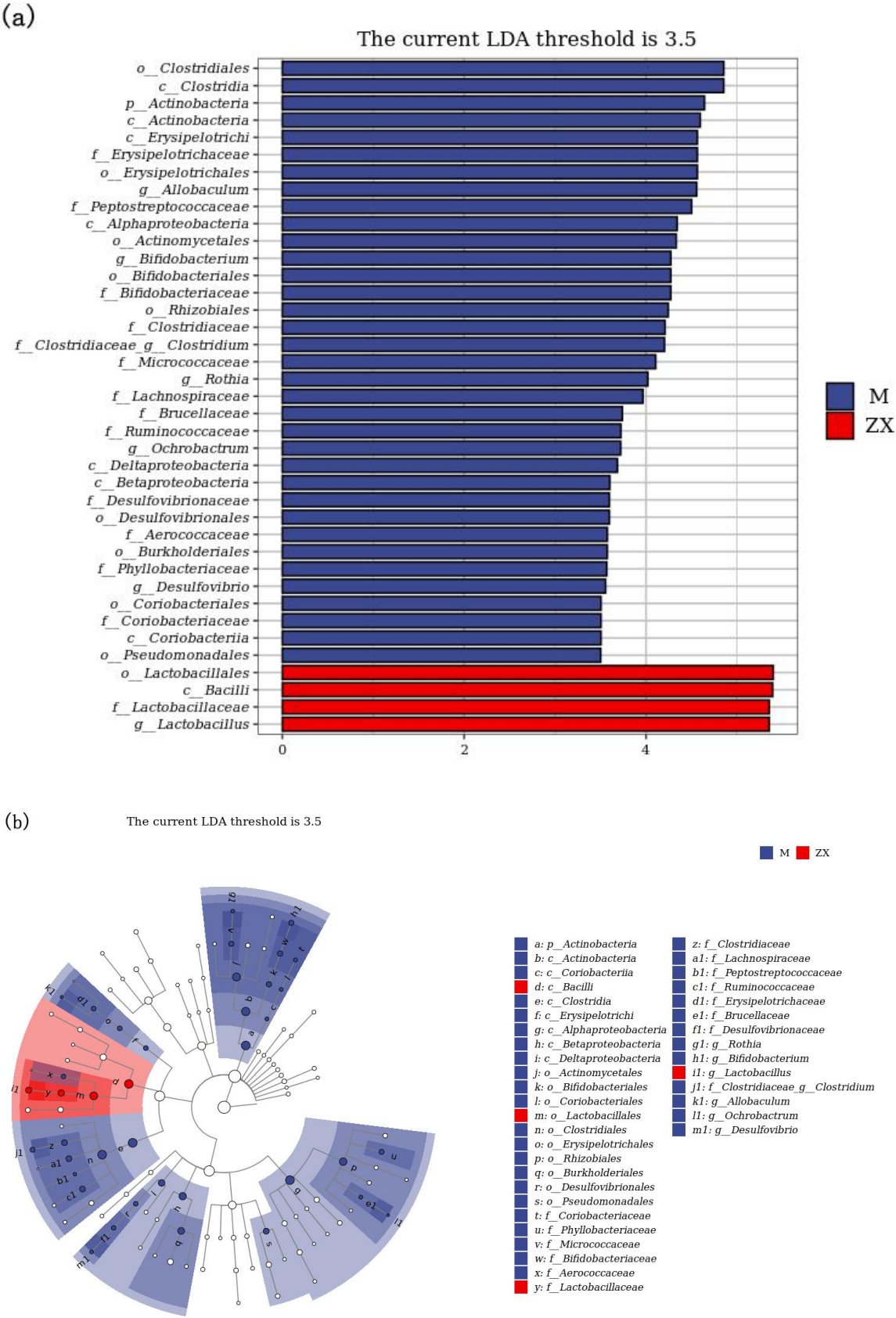


图 17 中西药联用组与模型组大鼠食管菌群 LefSe 分析

4 讨论

对肠道菌群的研究逐渐改变了人们对食管疾病的认识。在过去的二十年中, 16S rRNA 基因测序被用于表征和比较健康个体与食管疾病患者的食管菌群, 这些疾病包括胃食管反流病、食管腺癌、嗜酸性食管炎和食管动力障碍等^[14, 109]。分析食管中正常菌群和失调菌群之间的组成差异, 有助于进一步了解胃食管反流病和相关并发症的发病机制。

有学者对正常食管和 GERD 食管菌群进行检测, 发现检测对象的食管微生物群可分为 I 型和 II 型两大类。健康人的食管微生物群 91.7% 属于 I 型, I 型微生物组以链球菌等革兰氏阳性菌为主; 而 59.1% 的 GERD 患者的食管微生物群属于 II 型, 而 II 型微生物组含有大量的革兰氏阴性厌氧或微需氧菌。在从 I 型微生物组向 II 型微生物组变化的趋势为, 厚壁菌、链球菌和轻链球菌的丰度降低, 而拟杆菌、变形菌和梭杆菌的丰度增多^[30]。有研究指出, 在正常食管中未发现梭菌, 但是在 RE 和 BE 的门水平分别发现了 10%、9% 的梭菌^[32]。有研究指出, 在正常食管中未发现梭菌, 但是在 RE 和 BE 的门水平中分别发现了 10%、9% 的梭菌^[32]。余英等^[110]研究 RE 严重程度与食管黏膜菌群结构变化的关系, 结果显示 RE 患者中鉴定的 4 种主要门类是厚壁菌门 (37.0%), 放线菌门 (37.8%), 拟杆菌门 (13.3%) 和变形菌门 (11.1%), 占总细菌数的 99% 以上。并且发现, 随着 RE 程度加重, γ -变形菌纲含量明显升高, 重度 RE 组高于轻度 RE 组, 这与 γ -变形菌纲中的某些致病菌含量增多导致炎症发生有关。在本研究中, 我们发现在门水平, 各组鉴定到的主要门类有厚壁菌门、变形菌门、放线菌门、拟杆菌门、OD1 和 TM7 等, 前 4 种菌门在每组均占 85% 以上的比例。厚壁菌门在模型组和假手术组中都是优势菌门, 相对丰度在 50% 以上, 但是模型组中厚壁菌门的相对丰度较假手术组降低, 模型组中变形菌门、放线菌门的相对丰度比假手术组有所增高。在属水平, 各组鉴定到的主要菌属有乳杆菌属、链球菌属、Aggregatibacter、双歧杆菌属、阿洛巴氏菌属、

梭菌属等。在假手术组中,乳杆菌属和链球菌属为优势均属,但模型组中乳杆菌属和链球菌属相对丰度明显降低。厚壁菌门是一大类细菌,多数为革兰氏阳性菌,乳杆菌属和链球菌属也都属于革兰氏阳性菌;变形菌门是细菌中最大的一门,包括很多病原菌,均为革兰氏阴性菌。在本研究中,模型组也存在革兰氏阳性菌减少、革兰氏阴性菌增多这一趋势。这一结果与前人的研究具有一致性。并且经 Anosim 分析,假手术组与模型组组间的菌群组成差异具有统计学意义($P<0.01$),证实了反流性食管炎的食管菌群与正常食管相比确实发生了结构上的改变。

经过药物干预后,食管菌群的组成与模型组相比再次出现了变化。在门水平,西药组、中药组和中西药联用组中厚壁菌门相对丰度明显增加(西药组>中西药联用组>中药组>假手术组>模型组),变形菌门较模型组明显降低(西药组<中西药联用组<中药组<假手术组<模型组);在属水平,西药组、中药组和中西药联用组中乳杆菌属相对丰度明显增加(中药组>中西药联用组>西药组>假手术组>模型组);西药组和中西药联用组的链球菌属的相对丰度较模型组也增加(假手术组>西药组>中西药联用组>模型组)。β多样性分析中的 PCoA 分析也显示中药组和中西药联用组的食管菌群分布与假手术组更为接近,Anosim 分析通过统计学检验证实了这一点,假手术组与中药组和中西药联用组间菌群组成无明显差异($P>0.05$),而模型组与西药组、中药组、中西药联用组菌群组成有显著差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。以上结果表明,中药清郁和降汤及西药 PPI 联合促胃肠动力药均能调节反流性食管炎的食管菌群,调节的趋势为增加革兰氏阳性菌的丰度,降低革兰氏阴性菌的丰度,而其中以中药组和中西药联用组的变化趋势更接近于正常食管。

经 LEfSe 分析,发现与另外四组相比,模型组中共有的标志物种(biomarker)在属水平为苍白杆菌属、脱硫弧菌属、阿洛巴氏菌属。苍白杆菌属为革兰氏阴性菌,临床中最常分离到的苍白杆菌属细菌为人苍白杆菌(*Ochrobactrum anthropi*),可引起菌血症、败血症、脑膜炎、腹膜炎、

感染性心内膜炎、化脓性关节炎、眼内炎、骨髓炎等多种疾病^[111]，已成为人类常见的病原菌。脱硫弧菌属也是革兰氏阴性菌，有研究指出肠道中脱硫弧菌属的数量和多样性与结肠炎、肠易激综合征、溃疡性结肠炎等疾病的发生密切相关^[112-114]；脱硫弧菌属的代谢产物，如 IL-6、IL-8 等炎症因子，也是导致肠道疾病发生和发展的关键因素^[115]。阿洛巴氏菌属的相对丰度与衰老、肥胖、高脂饮食、糖尿病等密切相关^[116, 117]；阿洛巴氏菌属在炎症中也起着重要作用，Cox 等^[118]人研究指出阿洛巴氏菌属的相对丰度与回肠 ROR γ T 和 IL-17 呈正相关；Miyauchi 等^[119]人发现阿洛巴氏菌属菌株 (OTU002) 与自身免疫性脑炎的易感性增加有关。可见，苍白杆菌属、脱硫弧菌属和阿洛巴氏菌属对人体健康有着十分重要的影响。

苍白杆菌属和脱硫弧菌属都属于变形菌门。变形菌门是人类肠道微生物群中最丰富的门之一，变形杆菌的一个共同特征是革兰氏阴性染色，其主要外膜为脂多糖 (LPS)^[120]。由脂多糖维持的低度炎症与代谢紊乱的发展之间的联系已经得到了很好的证实^[121]。Cani 等^[122, 123]研究发现 LPS 的产生是由肠道中的革兰氏阴性细菌维持的，给予抗生素可以减少代谢性内毒素血症和盲肠内毒素的含量。在鉴定可能与内毒素血症的发生和代谢紊乱发展有关的细菌的研究中，经常发现变形杆菌数量增加^[124-126]。而革兰氏阴性菌的细胞外膜 LPS 还可以激活食管上皮细胞 TLR4，通过 TLR4/NF- κ B 信号通路，诱导炎症因子过度表达，引起强烈的炎症反应，导致食管黏膜的损伤。

经 LEfSe 分析，假手术组、中药组、西药组和中西药联用组的标志物种均为乳杆菌属。乳杆菌是革兰氏阳性菌，也是人体有益菌，目前乳杆菌制剂已经作为益生菌被广泛应用到多种疾病的治疗中。通过本研究中也证实，乳杆菌属是反流性食管炎的保护因素，一方面在正常食管中发挥保护作用，另一方面通过药物干预提高乳杆菌属的丰度有利于食管黏膜损伤的恢复。其机制可能是通过抑制致病菌的繁殖、抗炎性反应、免疫调节、维持和提高黏膜屏障功能等起到保护食管黏膜的作用^[127]，但其中的具体

机制还有待进一步深入研究。

综上所述，清郁和降汤可以提高革兰氏阳性菌的丰度（以乳杆菌属为标志菌属），增加有益菌的比例，减少革兰氏阴性菌的丰度（主要是苍白杆菌属、脱硫弧菌属等），我们预测它同时能减少革兰氏阴性菌 LPS 对 TLR4/NF- κ B 通路的炎症级联诱导，这部分研究将在下一部分进行阐述。

实验二 清郁和降汤对反流性食管炎模型大鼠 LPS/TLR4/NF- κ B 通路及食管黏膜屏障的影响

1 实验材料

1.1 试剂

名称	厂家
大鼠白介素 1 β (IL-1 β) ELISA 试剂盒 (E-EL-R0012c)	Elabscience
大鼠白介素 6 (IL-6) ELISA 试剂盒 (E-EL-R0015c)	Elabscience
大鼠白介素 8 (IL-8) ELISA 试剂盒 (MM-0175R2)	江苏酶免实业有限公司
大鼠脂多糖/内毒素 (LPS) ELISA 试剂盒 (CSB-E14247r)	CUSABIO
Servicebio®RT First Strand cDNA Synthesis Kit (G3330)	Servicebio
2 $\times$ Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix (G3326)	Servicebio
TRIZLO (252250AX)	Aidlab
RIPA 裂解液 (P0013B)	Beyotime
磷酸酶抑制剂 (S1873)	Beyotime
PMSF (P105539)	阿拉丁
胞浆核蛋白提取试剂盒 (KGP150)	南京凯基生物
BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (P0010)	Beyotime
蛋白 marker (10-250KD) (P12103-2)	海利克思
兔多抗 GAPDH (AB-P-R 001)	杭州贤至生物有限公司

兔单抗 NF- κ B P65 (ab-32536)	Abcam
兔多抗 TLR4 (19811-1-AP)	武汉三鹰生物技术有限公司
兔多抗 cldn1 (bs-1428R)	北京博奥森生物技术有限公司
兔多抗 cldn4 (ab15104)	Abcam
HRP 标记羊抗兔二抗 (BA1054)	武汉博士德生物工程有限公司
ECL 底物液 (P1050)	北京普利莱基因技术有限公司

1.2 仪器

名称	厂家
冷冻高速离心机 (H1650R)	湖南湘仪实验室仪器开发有限公司
电热恒温培养箱 (ICV-450)	日本 ASONE
组织研磨器 (Tissulyser-24)	上海净信
多功能酶标仪 (Flexstation3)	Molecular Devices
电子天平 (CPA)	北京赛多利斯仪器系统有限公司
微量移液器	北京大龙公司
荧光定量 PCR 仪 (Gene Amp® 5700)	Applied Biosystems
微型旋涡混合仪 (WH-3)	上海沪西分析仪器厂有限公司
微量移液器	Eppendorf
电泳仪电源 (DYY-7C)	北京六一仪器厂
垂直电泳槽 (DYCZ-24DN)	北京六一仪器厂
电转仪 (DYCZ-40)	北京六一仪器厂
水平摇床 (TS-1)	江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司
磁力搅拌器 (T8-1)	江苏省金坛市中大仪器厂
酶标仪 (m μ 11SKANMK3)	Thermo

1.3 动物

(同上)

1.4 药物制备

(同上)

2 实验方法

2.1 模型制备

(同上)

2.2 分组及给药

(同上)

2.3 取材

(同上)

2.4 观察指标及方法

2.4.1 一般情况

观察并记录各组大鼠的毛发色泽及脱落、活动、精神状态、进食量、饮水量，大便性状及体重等情况。

2.4.2 食管组织肉眼表现及病理学观察

先肉眼观察食管组织表现，然后将置于 4%多聚甲醛中保存的食管组织进行石蜡包埋，制作病理切片，HE 染色后，在光学显微镜下观察大鼠食管组织病理学表现。

2.4.3 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

采用 ELISA 法检测大鼠血清中及食管组织中脂多糖 (LPS)、白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-6、IL-8 含量。操作步骤按照试剂盒说明书进行。

2.4.3.1 IL-6、IL-1 β 的实验步骤

①加样：分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加标准品&样品稀释液 100 μ L，余孔分别加标准品或待测样品 100 μ L。

②温育：给酶标板覆膜，37℃孵育 90 分钟。

③弃去孔内液体，甩干，不用洗板，每孔中加入生物素化抗体工作液 100 μ L，给酶标板加上覆膜，37℃温育 1 小时。

④弃去液体，洗板 3 次，每次浸泡 30S，大约 350 μ L/每孔，甩干并在吸水纸上轻拍将孔内液体拍干。

⑤每孔加酶结合物工作液 100 μ L，加上覆膜，37℃温育 30 分钟。

⑥弃去孔内液体，甩干，洗板 5 次。

⑦每孔加显色剂（TMB）90 μ L，酶标板加上覆膜 37℃避光孵育 15 分钟。

⑧每孔加终止液 50 μ L，终止反应，此时蓝色立转黄色。

⑨立即用酶标仪在 450nm 波长测量各孔的光密度（OD 值）。

2.4.3.2 LPS 的实验步骤

①加样：同 IL-6 和 IL-1 β 的步骤①。

②温育：给酶标板覆膜，37℃孵育 2 小时。

③同 IL-6 和 IL-1 β 的步骤③。

④同 IL-6 和 IL-1 β 的步骤④。

⑤每孔加酶结合物工作液 100 μ l，加上覆膜，37℃温育 1 小时。

⑥余下实验步骤同 IL-6 和 IL-1 β 的步骤⑥-⑨。

2.4.3.2 IL-8 的实验步骤

①加样：各孔设置同 IL-6 和 IL-1 β 。空白孔加标准品&样品稀释液 50 μ l，余孔分别加标准品或待测样品 50 μ l。

②温育：给酶标板覆膜，37℃孵育 30 分钟。

③弃去孔内液体，洗板 5 次，每孔中加入酶标记结合物工作液 50 μ l，给酶标板加上覆膜，37℃温育 30 分钟。

④弃去液体，洗板 5 次，每次浸泡 30S，大约 350 μ l/每孔，甩干后将孔内液体拍干。

⑤每孔加显色剂 A 50 μ l，再加显色剂 B 50 μ l，酶标板加上覆膜 37℃避光孵育 15 分钟。

⑥余下实验步骤同 IL-6 和 IL-1 β 的步骤⑧-⑨。

2.4.4 实时荧光定量聚合酶链式反应（Real-time PCR）

引物信息

引物名称	引物序列	片段长度 (bp)
R-TLR4-S	CCAGGTGTGAAATTGAGACAATTG	191
R-TLR4-A	AAGCTGTCCAATATGGAAACCC	
R-NFKB-P65-S	CAGATACCACTAAGACGCACCC	227
R-NFKB-P65-A	CTCCAGGTCTCGCTTCTTACA	
R-Clbn1-S	CTTCGACTCCTTGCTGAATCTGA	316
R-Clbn1-A	AGCAGCCCAGCCAGTAAAGA	
R-Clbn4-S	GCCAGATGCAGTGCAAGATGT	235
R-Clbn4-A	CAGGACACAGGCACCATAATCA	
R-GAPDH-S	CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
R-GAPDH-A	GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	

① 总 RNA 抽提

取适量新鲜组织浸泡在 RNA isolater 中, 加入 4-5 颗研磨珠, 匀浆器低温高速匀浆 5-6 次, 每次 5min。

然后以 12000 转、4 度的条件离心 5min, 吸取上清。向上述裂解液加入 1/5 体积三氯甲烷, 涡旋仪 10s~30s 成乳浊液, 4 度静置 5min。

然后以 12000 转、4 度的条件离心 15min。离心液分 3 层, 吸取上层水相, 为避免中间层污染, 可舍弃少量接近中间层的水相部分。加入等体积 4 度预冷异丙醇, 涡旋 10s 左右混匀, 此时可见白色絮状悬浮物, 4 度静置 10min。

然后以 12000 转、4 度的条件离心 10min, 通常可看到白色沉淀。直接倒掉上清液, 加 1ml DEPC 水配置的 75%乙醇, 充分洗涤管壁、管壁, 轻弹管底, 用涡旋仪使沉淀悬浮, 4 度静置 3-5min。然后以 12000 转、4 度的条件离心 5min。

倒去上清, 静置后再用移液器吸取少许回流液。洁净环境中敞口干燥沉淀 2-5min。加入适量 DEPC 水溶解沉淀, 40mg 组织样本提取的 RNA 约 100ul 水溶解。

最后对 RNA 质量进行测定。

②RNA 反转成 cDNA

1) 逆转录反应体系配制 (推荐 20 μ L 反应体系)

Component	Volume
5 x Reaction Buffer	4 μ L
Oligo (dT)18 Primer (50 μ M)	1 μ L
Servicebio®RT Enzyme Mix	1 μ L
Total RNA/mRNA*	10 μ L
RNase free water	Add to 20 μ L

2) 轻轻混匀并离心

3) 逆转录程序设置

Temperature	Time
25°C	5 min
42°C	30 min
85°C	5 sec

③定量 PCR

1) 取 0.2ml PCR 管, 配制如下反应体系:

Component	Volume
2×Universal Blue SYBR Green qPCR Master	10 μ l
Forward Primer	0.4 μ l
Reverse Primer	0.4 μ l
Template	2 μ l
Nuclease-Free Water	Add to 20 μ L

2) PCR 扩增: 95°C 预变性 30s, 1 个循环; 95°C 变性 15s, 60°C 退火 30s, 40 个循环。

④结果处理: 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算。

2.4.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot)

2.4.5.1 蛋白样品的制备

①蛋白的提取

将少量组织置于 2ml EP 管中, 加入匀浆珠。往管中加 200 μ l 单去污剂裂解液裂解, 置于自动匀浆机中进行匀浆。将匀浆结束的 EP 管置于冰

上裂解 30min。然后将裂解液移至 1.5ml 离心管中，4℃、12000rpm 离心 5min，收集上清，并置于-20℃冰箱保存。

②蛋白浓度的测定

将蛋白样品进行适当稀释（取样品 1 μ l，与 19 μ l 的 PBS 混合进行稀释。将 BSA 标准品进行稀释，制成蛋白浓度为 1、0.8、0.6、0.4、0.2 的标准蛋白（单位：mg/ml）。将 PBS 稀释过的蛋白样品、稀释过的标准蛋白分别加入 96 孔板内，标准品各设 2 个平行孔，待测样品设 3 个平行孔，每孔加入体积 20 μ l。加入 PBS 的 2 个平行孔为空白对照。按 50:1 比例将 BCA 试剂盒中 A 液和 B 液进行混合，将混合液加入 96 孔板内，每孔加入 200 μ l。37℃避光孵育 15min。用 DG-3022A 酶标仪测定 OD568。根据标准蛋白浓度和相应的 OD 值计算直线回归方程，根据蛋白样品 OD 值，利用回归方程计算出样品蛋白浓度。

③蛋白变性

将提取的蛋白上清与 5x 蛋白上样缓冲液（体积比按照 4:1 混合），放入沸水中进行沸水浴 10min，煮样时间根据样本是否透亮或粘稠进行调整。变性完后冷却至室温再放入-20℃冰箱进行保存。

2.4.5.2 电泳

①电泳胶的制备

将玻璃板洗净擦干，固定在制胶器上，配置分离胶，把分离胶灌入到玻璃板空隙内适当的高度，将分离胶用无水乙醇进行覆盖，直到分离胶凝固。倒去无水乙醇，用双蒸水冲洗后用滤纸吸干。然后加入浓缩胶到合适的高度，插入梳齿。等浓缩胶凝固好后取下梳齿。电泳胶按以下体系配置：

凝胶浓度	成分	体积/ml
12%分离胶	水	6.6
	30%丙烯酰胺	8.0
	1.5Mtris-HCl (pH8.8)	5.0
	10%SDS	0.2
	APS	0.2
	TEMED	0.008
	总体积	20
凝胶浓度	成分	体积/ml
5%浓缩胶	水	4.1
	30%丙烯酰胺	1.0
	1.0Mtris-HCl (pH6.8)	0.75
	10%SDS	0.06
	APS	0.06
	TEMED	0.006
	总体积	6

②电泳分离

将制备好的胶固定到电泳槽上，加电泳液后上样电泳。先恒压 80V 电泳至溴酚蓝指示剂在浓缩胶与分离胶交界处成线状，然后用恒压 120V 电泳至溴酚蓝到凝胶底部，耗时约 1.5h。

2.4.5.3 电转移

取出凝胶根据 Marker 切下目的条带，用蒸馏水冲洗，准备与 PAGE 凝胶大小相同的 PVDF 膜和滤纸，甲醇浸泡 PVDF 膜数秒后，将其和滤纸一起浸泡于电转缓冲液中。按照黑色板-纤维垫-滤纸-凝胶-PVDF 膜-滤纸-纤维垫-白色板依次放好，夹紧板后放入转膜仪内，黑色板的一面对照黑色负极。加满电转液后开始转膜。转膜条件：cldn1、cldn4, 200mA, 70min;

GAPDH, 200mA, 90min; NF- κ B, 200mA, 120min; TLR4, 200mA, 120min 后 300mA, 15min。

2.4.5.4 免疫反应

①将 PVDF 膜置于 TBST（封闭液）中浸泡，室温摇床封闭 2h。

②稀释一抗，让 PVDF 膜浸泡在一抗孵育液中，4℃孵育过夜。抗体稀释比例如下：

一抗名称	稀释比例
GAPDH	1:1000
NF- κ B	1:3000
TLR4	1:500
cldn1	1:1000
cldn4	1:1000

③TBST 充分洗涤 PVDF 膜 5 次，每次 5min。

④用 TBST 稀释相应的 HRP 标记二抗，稀释比例为 1:10000，让 PVDF 膜浸泡在二抗孵育液中，室温摇床孵育 2h。

⑤TBST 充分洗涤 PVDF 膜 5 次，每次 5min。

⑥将 ECL 试剂中的增强液和稳定的过氧化物酶溶液等体积混匀，将工作液滴于 PVDF 膜上，充分反应待荧光带明显后，去除残留底物液，盖上保鲜膜，用 X 光胶片进行压片后依次放入显影液、定影液进行显影和定影。

⑦将冲洗后的胶片晾干，并将胶片扫描存档，用 image-pro plus 软件对胶片灰度值进行分析。

2.5 统计学分析

使用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计学分析。正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 法；非正态分布的计量资料用 M (P25, P75) 表示，组间比较采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况

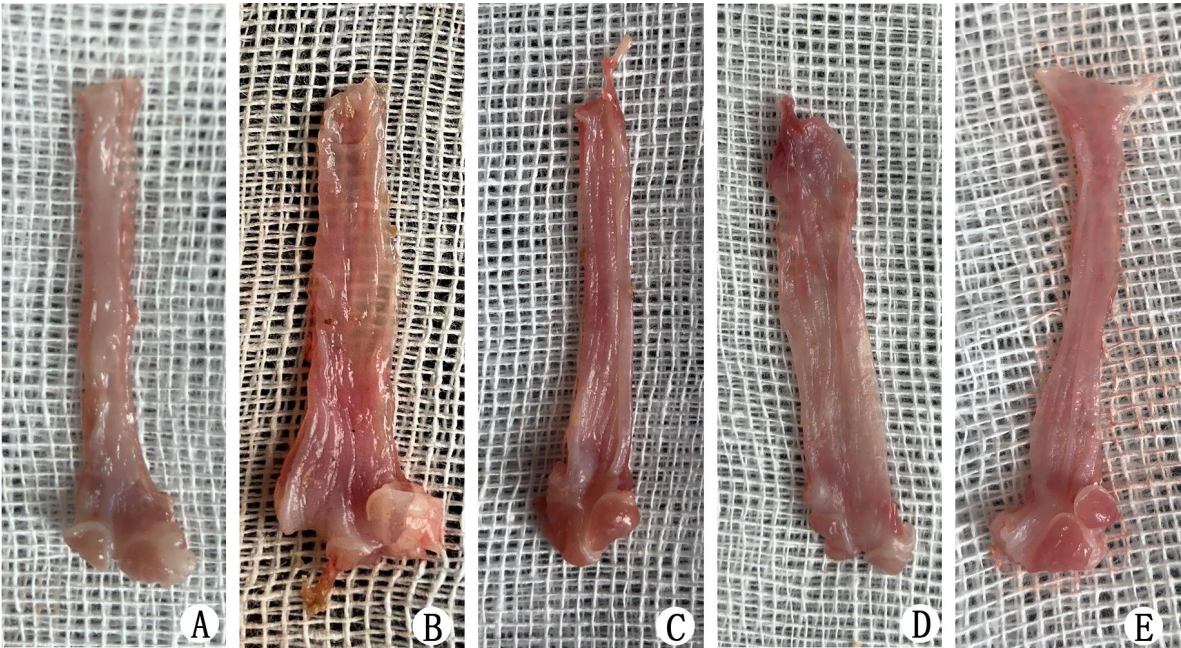
见实验一

3.2 模型评价

见实验一

3.3 各组大鼠食管黏膜肉眼观察及病理学表现

大体标本观察：假手术组大鼠食管黏膜光滑，肉眼未见病理改变。模型组大鼠食管黏膜可见点片状充血、糜烂，严重者可见溃疡，少数有增生白斑。中药组、西药组大鼠食管黏膜较为光滑，部分黏膜粗糙，散在充血点，多数可见水肿，未见糜烂、溃疡；中西药联用组大鼠食管黏膜光滑完整，少数可见充血水肿，未见糜烂、溃疡。见图 1。



注：A. 假手术组；B. 模型组；C. 中药组；D. 西药组；E. 中西药联用组（图 2 同）

图 1 各组大鼠食管组织肉眼观察

病理学表现：假手术组大鼠食管黏膜各组织层无明显炎症反应，偶见上皮细胞层内少量炎性细胞。模型组大鼠可见食管鳞状上皮增厚并伴有基底细胞增生，黏膜固有层乳头延伸，大量炎性细胞浸润，严重者可见黏膜糜烂或溃疡。中药组、西药组大鼠食管黏膜鳞状上皮增生较少，黏膜固有

层乳头较模型组缩短，小于上皮厚度的 2/3，可见少量慢性炎性细胞浸润，细胞间隙增宽，未见糜烂或溃疡。中西药联用组食管黏膜未见明显鳞状上皮及基底细胞增生，少数标本上皮细胞层内可见少量炎性细胞，未见糜烂和溃疡。见图 2。

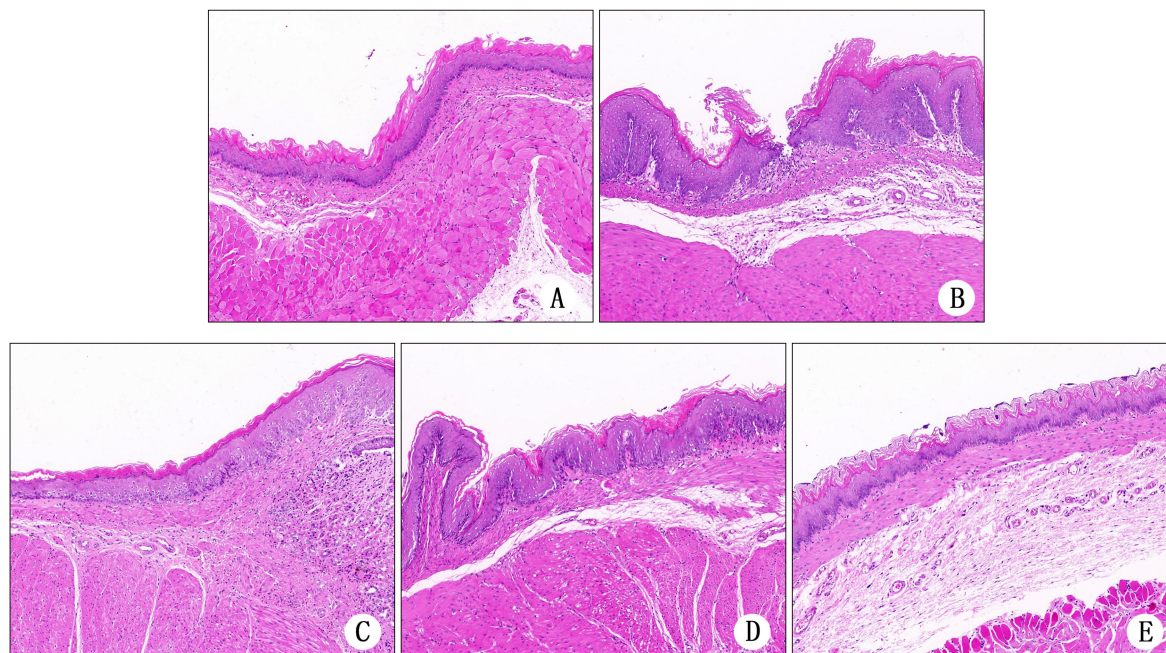


图 2 各组大鼠食管组织病理学表现 (HE, $\times 100$)

3.4 各组大鼠血清中 LPS、IL-1 β 、IL-6、IL-8 含量比较

与假手术组相比，模型组大鼠血清 LPS、IL-1 β 、IL-6、IL-8 表达明显增高 ($P < 0.01$)；与模型组相比，3 个治疗组大鼠血清 LPS、IL-1 β 、IL-6、IL-8 表达明显降低 ($P < 0.01$)；与中西药联用组相比，中药组、西药组大鼠血清 LPS、IL-1 β 、IL-6、IL-8 表达明显增高 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠血清中 LPS、IL-1 β 、IL-6、IL-8 含量比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	LPS	IL-6	IL-1 β	IL-8
假手术组	10	655.39 $\pm$ 62.60	15.94 $\pm$ 1.81	71.62 $\pm$ 5.95	154.86 $\pm$ 13.54
模型组	10	1394.60 $\pm$ 148.16 ²⁾	34.09 $\pm$ 3.52 ²⁾	143.01 $\pm$ 11.56 ²⁾	305.72 $\pm$ 28.93 ²⁾
西药组	10	1054.70 $\pm$ 104.60 ^{4) 6)}	28.85 $\pm$ 2.87 ^{4) 6)}	100.10 $\pm$ 8.87 ^{4) 6)}	222.79 $\pm$ 20.98 ^{4) 6)}
中药组	10	937.79 $\pm$ 94.61 ^{4) 6)}	28.48 $\pm$ 2.61 ^{4) 6)}	93.83 $\pm$ 8.54 ^{4) 6)}	227.70 $\pm$ 23.06 ^{4) 6)}
中西药联用组	10	772.31 $\pm$ 85.46 ⁴⁾	21.36 $\pm$ 2.85 ⁴⁾	82.14 $\pm$ 6.98 ⁴⁾	174.94 $\pm$ 16.87 ⁴⁾

注: 与假手术组相比 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组相比 ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与中西药联用组相比 ⁵⁾ $P < 0.05$,

⁶⁾ $P < 0.01$ 。(表 2-4 同)

3.5 各组大鼠食管组织中 LPS、IL-1 β 、IL-6、IL-8 含量比较

与假手术组相比, 模型组大鼠组织 LPS、IL-1 β 、IL-6、IL-8 表达明显增高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 3 个治疗组大鼠组织 LPS、IL-1 β 、IL-6、IL-8 表达明显降低 ($P < 0.01$)。与中西药联用组相比, 中药组、西药组大鼠组织 LPS、IL-1 β 、IL-6、IL-8 表达明显增高 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 各组大鼠食管组织中 LPS、IL-1 β 、IL-6、IL-8 含量比较 (pg/g, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	LPS	IL-6	IL-1 β	IL-8
假手术组	10	5289.02 $\pm$ 762.93	134.44 $\pm$ 15.74	529.77 $\pm$ 52.92	1205.84 $\pm$ 94.36
模型组	10	12097.14 $\pm$ 1076.36 ²⁾	422.07 $\pm$ 38.49 ²⁾	1464.64 $\pm$ 130.87 ²⁾	2957.68 $\pm$ 219.14 ²⁾
西药组	10	9256.59 $\pm$ 948.02 ^{4) 6)}	238.36 $\pm$ 30.96 ^{4) 6)}	1085.98 $\pm$ 109.10 ^{4) 6)}	1932.47 $\pm$ 208.49 ^{4) 6)}
中药组	10	8825.33 $\pm$ 730.08 ^{4) 6)}	240.18 $\pm$ 31.39 ^{4) 6)}	1157.51 $\pm$ 94.39 ^{4) 6)}	2197.02 $\pm$ 188.45 ^{4) 6)}
中西药联用组	10	6174.53 $\pm$ 620.96 ⁴⁾	144.87 $\pm$ 14.25 ⁴⁾	627.38 $\pm$ 67.81 ⁴⁾	1574.49 $\pm$ 83.40 ⁴⁾

3.6 各组大鼠食管组织 TLR4、NF- κ B p65、Cldn1、Cldn4 mRNA 表达比较

与假手术组相比, 模型组大鼠食管组织 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 表达明显增高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 3 个治疗组 TLR4、NF- κ B p65 mRNA

表达明显降低 ($P<0.01$)。与中西药联用组相比, 中药组、西药组 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

与假手术组相比, 模型组大鼠食管组织 Cldn1、Cldn4 mRNA 表达明显降低 ($P<0.01$); 与模型组相比, 3 个治疗组 Cldn1、Cldn4 mRNA 表达明显增高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与中西药联用组相比, 中药组、西药组 Cldn1、Cldn4 mRNA 表达明显降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。见表 3。

表 3 各组大鼠食管组织 TLR4、NF- κ B p65、Cldn1、Cldn4 mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TLR4	NF- κ B p65	Cldn1	Cldn4
假手术组	8	0.48 $\pm$ 0.28	0.84 $\pm$ 0.64	163.20 $\pm$ 38.03	348.12 $\pm$ 135.29
模型组	8	65.65 $\pm$ 37.21 ²⁾	57.84 $\pm$ 39.71 ²⁾	1.96 $\pm$ 1.05 ²⁾	0.91 $\pm$ 0.33 ²⁾
西药组	8	29.84 $\pm$ 12.89 ⁴⁾	23.54 $\pm$ 17.36 ⁴⁾	62.20 $\pm$ 32.75 ^{4) 5)}	82.30 $\pm$ 24.34 ^{3) 6)}
中药组	8	29.11 $\pm$ 14.49 ⁴⁾	21.31 $\pm$ 18.66 ⁴⁾	49.66 $\pm$ 34.67 ^{4) 6)}	70.40 $\pm$ 24.96 ^{3) 6)}
中西药联用组	8	11.66 $\pm$ 9.64 ⁴⁾	9.68 $\pm$ 7.09 ⁴⁾	100.97 $\pm$ 20.48 ⁴⁾	265.26 $\pm$ 51.20 ⁴⁾

3.7 各组大鼠食管组织 TLR4、NF- κ B p65、Cldn1、Cldn4 蛋白表达比较

与假手术组比较, 模型组 TLR4、NF- κ B p65 蛋白的表达显著增加 ($P<0.01$); 与模型组比较, 3 个治疗组 TLR4、NF- κ B p65 蛋白表达明显降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与中西药联用组比较, 中药组、西药组 TLR4、NF- κ B p65 蛋白表达明显增加 ($P<0.01$)。

与假手术组比较, 模型组 Cldn1、Cldn4 蛋白的表达显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 3 个治疗组 Cldn1、Cldn4 蛋白表达明显增加 ($P<0.01$); 与中西药联用组比较, 中药组、西药组 Cldn1、Cldn4 蛋白表达明显降低 ($P<0.01$)。见图 3、表 4。

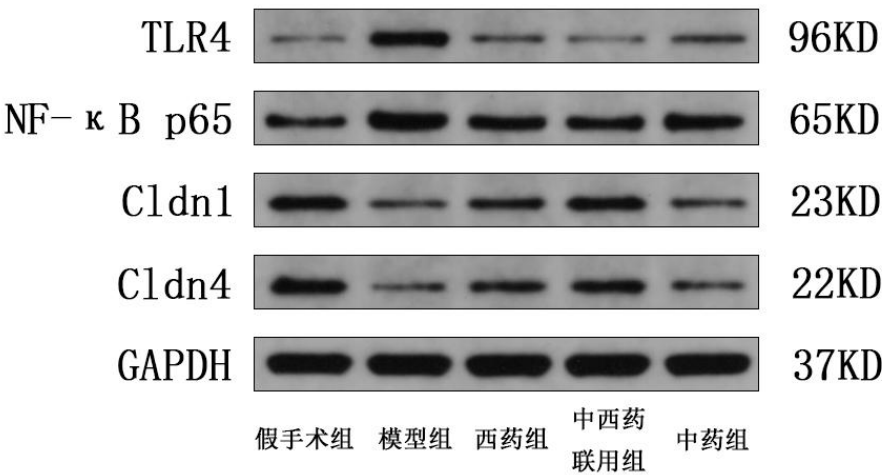


图 3 各组大鼠食管组织 TLR4、NF-κB p65、Cldn1、Cldn4 蛋白表达电泳

表 4 各组大鼠食管组织 TLR4、NF-κB p65、Cldn1、Cldn4 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TLR4	NF-κB p65	Cldn1	Cldn4
假手术组	8	0.09±0.01	0.43±0.04	0.67±0.08	0.71±0.09
模型组	8	0.61±0.07 ²⁾	0.79±0.09 ²⁾	0.25±0.03 ²⁾	0.14±0.02 ²⁾
西药组	8	0.21±0.03 ^{4) 6)}	0.68±0.07 ^{4) 6)}	0.40±0.04 ^{4) 6)}	0.45±0.05 ^{4) 6)}
中药组	8	0.26±0.03 ^{4) 6)}	0.71±0.08 ^{3) 6)}	0.35±0.05 ^{4) 6)}	0.27±0.04 ^{4) 6)}
中西药联用组	8	0.13±0.02 ⁴⁾	0.55±0.04 ⁴⁾	0.53±0.06 ⁴⁾	0.56±0.06 ⁴⁾

4 讨论

4.1 清郁和降汤对大鼠一般情况和食管黏膜的影响

在本实验中，假手术组大鼠毛发色泽光鲜、较少脱落，活动敏捷，食量较多，大便成形，体重逐步增加；造模期间，造模的大鼠均出现不同程度的毛发色泽变暗及脱落，活动减少，喜扎堆，容易应激，进食饮水量减少，便溏，体重减轻等表现，部分大鼠后期还出现了打嗝、嘴边可见涎水样液体流出等表现；灌胃期间，中药组、西药组及中西药联用组上述症状逐渐恢复，中西药联用组恢复最快，而模型组恢复缓慢，部分症状（如打嗝、流涎水等）始终存在。对大鼠食管标本肉眼及病理学的观察可以看到，假手术组均未见明显异常；与假手术组比较，模型组大鼠食管黏膜损伤最严重，肉眼及镜下观察可见糜烂或溃疡，镜下可见大量炎性细胞浸润，食

管鳞状上皮增厚及基底细胞增生等表现。与模型组相比,中药组、西药组大鼠食管黏膜损伤明显减轻,未见糜烂、溃疡,仅见部分黏膜粗糙,散在充血点及水肿,镜下炎症表现也较模型组明显减轻;而中西药联用组黏膜光滑完整,恢复程度最高。这表明三组药物均能有效改善大鼠食管的黏膜损伤,而中西药联用组恢复程度最高,进一步证实了清郁和降汤治疗 RE 的有效性,与西药联用还能起到协同作用。

4.2 清郁和降汤对 RE 大鼠食管组织 LPS/TLR4/NF- κ B 通路的影响

4.2.1 LPS/TLR4/NF- κ B 通路在食管黏膜损伤中的作用

RE 患者食管黏膜损伤是由多种因素共同作用所致,食管黏膜屏障功能受损是其病理机制之一。食管黏膜上皮防御屏障由多层鳞状上皮细胞膜及细胞间的紧密连接(tight junction, TJ)组成,可防止 H^+ 进入细胞内,缓冲或清除已经进入细胞内的 H^+ 。TJ 由 occludin、claudin、胞质紧密黏连蛋白及连接黏附分子等各类蛋白共同组成。食管黏膜上皮屏障功能损伤与紧密连接复合物的解离或缺失有密切联系^[128, 129]。传统观点认为,来自胃和十二指肠的反流物可以直接破坏食管黏膜上皮的细胞间紧密连接,使 H^+ 可以进入细胞内,从而导致食管黏膜的损伤和炎症反应^[130]。但后来有研究发现,反流性食管炎不是从上皮表面开始的化学损伤,而是从淋巴细胞的黏膜下浸润开始,然后向上发展到上皮表面^[104]。Dunbar 等^[131]也提出反流的胃液可能不会直接损害食管,而是会引发细胞因子介导的炎症反应,最终导致食管损伤。这表明炎症是导致食管黏膜损伤的重要因素之一。

整体观念是中医学理论体系的基本特点之一,认为人体是一个有机整体,强调人体内外环境的平衡、协调与统一,当平衡状态遭到破坏时就会导致疾病的发生。现代医学也认为,人体与微生物共同组成一个有机整体,相互依存、相互影响,微生态的改变与疾病的发生密切相关^[131]。食管具有多样化的常驻菌群,与正常食管相比,RE 食管出现了以革兰氏阳性菌丰度降低和革兰氏阴性菌丰度增加为特征的改变^[14, 15, 132]。与本课题的实验一对食管菌群的检测结果是一致的。而革兰氏阴性菌增多,其外膜的主

要成分 LPS 也会相应增多。在本实验中,与假手术组相比,模型组大鼠血清及食管黏膜 LPS 含量明显增高 ($P<0.01$),也证实了这一点。

固有免疫系统能够识别细菌、真菌、病毒等微生物,是抗病原体的第一道防线。免疫系统的这种特有的识别功能需要模式识别受体的参与。Toll 样受体是模式识别受体家族中的一员,TLR4 是首个被发现的 Toll 样受体,并且也是最重要的 Toll 样受体^[98]。LPS 是 TLR4 的重要配体,TLR4 可识别 LPS 并启动活化信号,LPS 与 TLR4 结合后可引起 $I\kappa B\alpha$ 降解, $I\kappa B\alpha$ 降解后与 NF- κB 解离,NF- κB 信号通路活化,诱导促炎性因子过度表达,介导炎症反应^[17]。多项研究表明 GERD 食管粘膜 NF- κB 的表达水平明显升高^[133-135],同时粘膜内炎症因子 IL-1、IL-8 的表达水平也明显升高^[134, 136]。也有研究指出,沿着反流性食管炎^[137, 138]、Barrett 食管^[134, 139]至食管腺癌的发展过程中 NF- κB 的活化在逐渐增加,同时 IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 TNF- α 等炎症因子的分泌也随之增加^[140]。

炎症因子(如 IL-1 β 、IL-6 等)可介导紧密连接蛋白表达失调和分布异常,从而导致食管黏膜屏障功能的损伤^[141, 142]。Claudins 是食管上皮紧密连接的重要功能蛋白,可直接作用于参与 TJ 的膜相关蛋白的鸟苷酸激酶同工酶及 ZO-1、ZO-2、ZO-3 等结构来维持 TJ 特有的栅栏以及屏障功能,对维持上皮细胞屏障及紧密连接的完整性有重要作用^[143, 144]。Claudin 蛋白的表达异常可直接影响到整个紧密连接蛋白系统的结构和功能^[145]。当细胞间紧密连接功能下降,上皮细胞的极性就将受到干扰,同时,上皮细胞之间的渗透屏障结构和功能也受到影响,导致潜在的有害物质或病原体有机会进入机体^[146]。有研究发现,与正常组比较,GERD 模型组食管黏膜 Cldn1、Cldn4 表达显著降低 ($P<0.0001$),经 NF- κB 抑制剂治疗后,食管黏膜 Cldn1、Cldn4 表达水平明显升高^[17]。

在本研究中,食管黏膜 TLR4、NF- κB p65 mRNA 和蛋白表达水平均明显升高 ($P<0.01$),TLR4、NF- κB 被激活,同时炎症因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8 表达水平上调 ($P<0.01$),Cldn1、Cldn4 mRNA 和蛋白表达明显下调

($P<0.01$)，证实了 LPS/TLR4/NF- κ B 通路参与食管炎性反应，破坏食管黏膜屏障功能，最终导致食管黏膜的损伤。

4.2.2 清郁和降汤对 LPS/TLR4/NF- κ B 通路的影响

RE 发病机制复杂，以单一靶点干预的治疗手段往往难以取得十分满意的效果。中药复方以整体观念、辨证论治和中药配伍原则为指导，具有多成分、多靶点的整体调节特点，对于反复发作的 RE 采用中医药干预治疗是一个良好的切入点。清郁和降汤具有疏肝清热、和胃降逆的作用，诸药升降相因、寒温并用，使肝气条达，肝火得清，胃气得降，中焦气机升降恢复平衡。脾胃纳运协调，气血生化有源，则正气充盛，进而可改善机体内环境，提高免疫力，抵御外界致病因子侵袭，即所谓“正气存内，邪不可干”。

本课题实验一对食管菌群的研究已证实，清郁和降汤能有效调节食管菌群，降低食管中革兰氏阴性菌的丰度，提高有益菌的丰度。而在本实验中，清郁和降汤干预的大鼠血清及食管组织 LPS 的表达显著下调，这可能与清郁和降汤下调革兰氏阴性菌的比例有关。本部分研究还发现，中药组、西药组、中西药联用组均能下调大鼠食管组织 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 和蛋白表达，下调炎症因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8 的表达，同时上调食管黏膜屏障中 Cldn1、Cldn4 mRNA 和蛋白表达，其中中西药联用组作用最显著。这一结果表明，清郁和降汤能抑制 TLR4/NF- κ B 通路的激活，减轻食管黏膜的炎性反应，有效加强食管上皮的细胞间紧密连接，增强食管黏膜防御屏障功能，从而起到保护食管黏膜的作用；同时，清郁和降汤与西药具有协同作用，能提高疗效。

综上所述，本次研究证实了食管菌群及 LPS/TLR4/NF- κ B 信号通路与反流性食管炎的相关性，证实了清郁和降汤可有效改善 RE 模型大鼠食管黏膜损伤，其具体作用机制可能是通过调节食管菌群，抑制 LPS/TLR4/NF- κ B 信号通路的激活来实现的。

结 语

一、结论

1. 清郁和降汤能有效治疗肝胃郁热型反流性食管炎,能协同西药提高临床疗效,并具有较好的远期疗效及安全性。

2. 反流性食管炎与食管菌群失调有关,食管菌群主要的变化趋势为革兰氏阳性菌的减少和革兰氏阴性菌的增多。

3. 清郁和降汤可通过调节反流性食管炎大鼠食管菌群,抑制LPS/TLR4/NF- κ B通路的活化,减轻食管炎症反应,增强食管黏膜屏障功能,修复食管黏膜损伤,实现对反流性食管的治疗作用。

二、创新点

1. 本课题首次同时研究了食管菌群与LPS/TLR4/NF- κ B通路在反流性食管炎发病中的作用,并尝试探索两者之间的联系。

2. 本课题研究了中药干预对反流性食管炎大鼠食管菌群的影响,并发现调节食管菌群是中药清郁和降汤治疗反流性食管炎的机制之一。为进一步研究反流性食管炎的病机及中医药治疗反流性食管炎提供了新思路。

三、不足与展望

1. 临床研究入组病例较少,病例来源相对单一,下一步可以扩大样本量进行多中心病例的研究。

2. 没有对临床反流性食管炎患者的食管菌群进行研究,下一步拟在临床开展食管菌群的研究。

3. 没有构建肝胃郁热型大鼠模型,希望在下一阶段能完善病症结合的大鼠模型,使研究结论更加严谨。

4. 本研究发现了食管菌群改变与反流性食管炎发病的相关性,也证实了中药清郁和降汤能调节食管菌群,而调节菌群常用的益生菌药物能否作用于食管菌群,能否对反流性食管炎起到有益作用,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Katz P O, Gerson L B, Vela M F. Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease[J]. Am J Gastroenterol, 2013, 108(3): 308-328, 329.
- [2] El-Serag H B, Sweet S, Winchester C C, et al. Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review[J]. Gut, 2014, 63(6): 871-880.
- [3] Richter J E, Rubenstein J H. Presentation and Epidemiology of Gastroesophageal Reflux Disease[J]. Gastroenterology, 2018, 154(2): 267-276.
- [4] Eusebi L H, Ratnakumaran R, Yuan Y, et al. Global prevalence of, and risk factors for, gastro-oesophageal reflux symptoms: a meta-analysis[J]. Gut, 2018, 67(3): 430-440.
- [5] 李军祥, 陈諒, 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(03): 221-226.
- [6] 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.
- [7] Spechler S J. Evaluation and Treatment of Patients with Persistent Reflux Symptoms Despite Proton Pump Inhibitor Treatment[J]. Gastroenterol Clin North Am, 2020, 49(3): 437-450.
- [8] 贾梦真, 高峰, 孙玥, 等. 香连片治疗反流性食管炎大鼠后食管黏膜菌群构成变化研究[J]. 中国医药, 2019, 14(12): 1842-1846.
- [9] Sandhu D S, Fass R. Current Trends in the Management of Gastroesophageal Reflux Disease[J]. Gut and Liver, 2018, 12(1): 7-16.
- [10] Yu J, Feng Q, Wong S H, et al. Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer[J]. Gut, 2017, 66(1): 70-78.

- [11] Marchesi J R, Adams D H, Fava F, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier[J]. Gut, 2016, 65(2): 330-339.
- [12] Bull M J, Plummer N T. Part 1: The Human Gut Microbiome in Health and Disease[J]. Integr Med (Encinitas), 2014, 13(6): 17-22.
- [13] D'Souza S M, Houston K, Keenan L, et al. Role of microbial dysbiosis in the pathogenesis of esophageal mucosal disease: A paradigm shift from acid to bacteria?[J]. World J Gastroenterol, 2021, 27(18): 2054-2072.
- [14] Corning B, Copland A P, Frye J W. The Esophageal Microbiome in Health and Disease[J]. Current Gastroenterology Reports, 2018, 20(8).
- [15] Blackett K L, Siddhi S S, Cleary S, et al. Oesophageal bacterial biofilm changes in gastro-oesophageal reflux disease, Barrett's and oesophageal carcinoma: association or causality?[J]. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 2013, 37(11): 1084-1092.
- [16] Deshpande N P, Riordan S M, Castaño-Rodríguez N, et al. Signatures within the esophageal microbiome are associated with host genetics, age, and disease[J]. Microbiome, 2018, 6(1).
- [17] Yu H, Wang X, Zhang L, et al. Involvement of the TLR4/NF- κ B Signaling Pathway in the Repair of Esophageal Mucosa Injury in Rats with Gastroesophageal Reflux Disease[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018, 51(4): 1645-1657.
- [18] Baghdadi J, Chaudhary N, Pei Z, et al. Microbiome, Innate Immunity, and Esophageal Adenocarcinoma[J]. Clinics in Laboratory Medicine, 2014, 34(4): 721-732.
- [19] 陈静, 曹正民, 徐蕾, 等. 中医药治疗反流性食管炎作用机制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2022: 1-15.
- [20] 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[硕士学位论文]. 湖北中医药大学, 2017.

- [21] Gorkiewicz G, Moschen A. Gut microbiome: a new player in gastrointestinal disease[J]. Virchows Arch, 2018, 472(1): 159-172.
- [22] Belkaid Y, Harrison O J. Homeostatic Immunity and the Microbiota[J]. Immunity, 2017, 46(4): 562-576.
- [23] Lacy B E, Spiegel B. Introduction to the Gut Microbiome Special Issue[J]. Am J Gastroenterol, 2019, 114(7): 1013.
- [24] Basson A, Trotter A, Rodriguez-Palacios A, et al. Mucosal Interactions between Genetics, Diet, and Microbiome in Inflammatory Bowel Disease[J]. Front Immunol, 2016, 7: 290.
- [25] Komaroff A L. The Microbiome and Risk for Obesity and Diabetes[J]. JAMA, 2017, 317(4): 355-356.
- [26] Lynch S V, Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease[J]. N Engl J Med, 2016, 375(24): 2369-2379.
- [27] Yang L, Chaudhary N, Baghdadi J, et al. Microbiome in reflux disorders and esophageal adenocarcinoma[J]. Cancer J, 2014, 20(3): 207-210.
- [28] Mannell A, Plant M, Frolich J. The microflora of the oesophagus[J]. Ann R Coll Surg Engl, 1983, 65(3): 152-154.
- [29] Pei Z, Bini E J, Yang L, et al. Bacterial biota in the human distal esophagus[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(12): 4250-4255.
- [30] Yang L, Lu X, Nossa C W, et al. Inflammation and Intestinal Metaplasia of the Distal Esophagus Are Associated With Alterations in the Microbiome[J]. Gastroenterology, 2009, 137(2): 588-597.
- [31] Di Pilato V, Freschi G, Ringressi M N, et al. The esophageal microbiota in health and disease[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2016, 1381(1): 21-33.
- [32] Liu N, Ando T, Ishiguro K, et al. Characterization of bacterial biota in the distal esophagus of Japanese patients with reflux esophagitis and

Barrett's esophagus[J]. BMC Infect Dis, 2013, 13: 130.

[33] Yu Y, Gao F, Chen X, et al. Changes in the distal esophageal microbiota in Chinese patients with reflux esophagitis[J]. J Dig Dis, 2019, 20(1): 18-24.

[34] Amir I, Konikoff F M, Oppenheim M, et al. Gastric microbiota is altered in oesophagitis and Barrett's oesophagus and further modified by proton pump inhibitors[J]. Environ Microbiol, 2014, 16(9): 2905-2914.

[35] Deshpande N P, Riordan S M, Castano-Rodriguez N, et al. Signatures within the esophageal microbiome are associated with host genetics, age, and disease[J]. Microbiome, 2018, 6(1): 227.

[36] Gall A, Fero J, McCoy C, et al. Bacterial Composition of the Human Upper Gastrointestinal Tract Microbiome Is Dynamic and Associated with Genomic Instability in a Barrett's Esophagus Cohort[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e129055.

[37] Baba Y, Iwatsuki M, Yoshida N, et al. Review of the gut microbiome and esophageal cancer: Pathogenesis and potential clinical implications[J]. Ann Gastroenterol Surg, 2017, 1(2): 99-104.

[38] 陈志浩, 李政奇, 王贵齐. 食管腺癌发生发展与慢性炎症的相关性研究[J]. 中国肿瘤, 2017, 26(09): 721-726.

[39] Neto A G, Whitaker A, Pei Z. Microbiome and potential targets for chemoprevention of esophageal adenocarcinoma[J]. Semin Oncol, 2016, 43(1): 86-96.

[40] Kaakoush N O, Castano-Rodriguez N, Man S M, et al. Is Campylobacter to esophageal adenocarcinoma as Helicobacter is to gastric adenocarcinoma?[J]. Trends Microbiol, 2015, 23(8): 455-462.

[41] Mozaffari N B, Soltan D M. Campylobacter Concisus and Its Effect on the Expression of CDX1 and COX2[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2018, 19(11): 3211-3216.

- [42] Elliott D, Walker A W, O'Donovan M, et al. A non-endoscopic device to sample the oesophageal microbiota: a case-control study[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2017, 2(1): 32-42.
- [43] Zaidi A H, Kelly L A, Kreft R E, et al. Associations of microbiota and toll-like receptor signaling pathway in esophageal adenocarcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2016, 16: 52.
- [44] Chen X, Yuan Z, Lu M, et al. Poor oral health is associated with an increased risk of esophageal squamous cell carcinoma - a population-based case-control study in China[J]. *Int J Cancer*, 2017, 140(3): 626-635.
- [45] Gao S, Li S, Ma Z, et al. Presence of *Porphyromonas gingivalis* in esophagus and its association with the clinicopathological characteristics and survival in patients with esophageal cancer[J]. *Infect Agent Cancer*, 2016, 11: 3.
- [46] Yu G, Gail M H, Shi J, et al. Association between upper digestive tract microbiota and cancer-predisposing states in the esophagus and stomach[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014, 23(5): 735-741.
- [47] Benitez A J, Hoffmann C, Muir A B, et al. Inflammation-associated microbiota in pediatric eosinophilic esophagitis[J]. *Microbiome*, 2015, 3: 23.
- [48] Harris J K, Fang R, Wagner B D, et al. Esophageal microbiome in eosinophilic esophagitis[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e128346.
- [49] Arias A, Vicario M, Bernardo D, et al. Toll-like receptors-mediated pathways activate inflammatory responses in the esophageal mucosa of adult eosinophilic esophagitis[J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2018, 9(4): 147.
- [50] Jackson M A, Goodrich J K, Maxan M E, et al. Proton pump inhibitors alter the composition of the gut microbiota[J]. *Gut*, 2016, 65(5): 749-756.
- [51] Freedberg D E, Lebwohl B, Abrams J A. The impact of proton pump inhibitors on the human gastrointestinal microbiome[J]. *Clin Lab Med*, 2014,

34(4): 771-785.

[52] Karmeli Y, Stalnikowitz R, Eliakim R, et al. Conventional dose of omeprazole alters gastric flora[J]. Dig Dis Sci, 1995, 40(9): 2070-2073.

[53] 王三强, 许敏光, 魏会珍, 等. 反流性食管炎中医学研究进展[J]. 陕西中医, 2020, 41(2).

[54] 李湘蓝, 金小晶. 金小晶用通法治疗反流性食管炎经验[J]. 吉林中医药, 2021, 41(10): 1289-1291.

[55] 赵旦娅, 郁宏文, 陆为民. 国医大师徐景藩从肺、胃、肝论治反流性食管炎经验[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(05): 2709-2711.

[56] 卢林林, 刘万里, 苏坤涵. 刘万里教授运用“降逆汤”治疗反流性食管炎经验[J]. 亚太传统医药, 2021, 17(02): 84-86.

[57] 翟兴红. 赵荣莱诊治反流性食管炎经验撷菁[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(04): 474-476.

[58] 叶影, 王德龙, 龙惠珍. 龙惠珍甘酸养阴法治疗反流性食管炎经验介绍[J]. 新中医, 2017, 49(09): 184-185.

[59] 梁光桦, 刘朝霞. 谢晶日教授治疗反流性食管炎经验[J]. 云南中医中药杂志, 2022, 43(02): 9-11.

[60] 郑榕, 杨正宁, 骆云丰, 等. 国医大师杨春波辨治反流性食管炎的经验[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(02): 473-475.

[61] 张声生, 李乾构, 朱生, 等. 胃食管反流病中医诊疗共识意见(2009, 深圳)[J]. 中医杂志, 2010, 51(09): 844-847.

[62] 张声生, 朱生樑, 王宏伟, 等. 胃食管反流病中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2017, 25(05): 321-326.

[63] 王维, 郭志玲, 曹云, 等. 胃食管反流病中医诊疗共识对比分析[J]. 北京中医药, 2019, 38(07): 716-718.

[64] 曹翠纳, 张北平, 赵喜颖. 半夏泻心汤对反流性食管炎患者临床疗效及焦虑、睡眠质量的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2018, 35(05): 779-784.

- [65] 吴振华, 杜昕, 严满, 等. 基于气机升降理论评价旋覆代赭汤加减治疗胃阴不足型反流性食管炎的临床疗效[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(02): 393-395.
- [66] 刘菊, 柳媛, 金振宇, 等. 旋覆代赭汤对反流性食管炎模型大鼠食管组织及外周血中 IL-18 及相关促炎因子表达的影响[J]. 江苏中医药, 2021, 53(06): 75-79.
- [67] 宋庆增, 谢胜, 黎丽群. 4 种经方对比质子泵抑制剂治疗反流性食管炎疗效的网状 Meta 分析[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(01): 249-252.
- [68] 李保双, 张丽颖, 彭珍婷, 等. 通降颗粒干预非糜烂性反流病肝胃不和证疗效观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(07): 915-919.
- [69] 程正义. 通降颗粒对反流性食管炎肝胃不和证模型大鼠胃肠动力的作用机制研究[硕士学位论文]. 中国中医科学院, 2016.
- [70] 岳胜利, 陆为民. 徐景藩运用泄肝和胃方治疗反流性食管炎经验[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(03): 476-478.
- [71] 王阿会, 朱生樑, 周秉舵, 等. 疏肝和胃颗粒治疗肝胃郁热型反流性食管炎疗效观察[J]. 上海中医药杂志, 2021, 55(03): 57-60.
- [72] 冯珍凤, 郭召平. 平冲降逆汤治疗反流性食管炎 50 例临床疗效评价[J]. 中医药信息, 2020, 37(05): 102-105.
- [73] 贾剑南, 唐艳萍, 刘茜. 活血通降方合并针灸治疗难治性反流性食管炎瘀血阻络型 63 例临床研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2019, 27(07): 485-490.
- [74] 徐因, 安俊丽, 杨志军, 等. 老十针治疗胃食管反流病的临床观察[J]. 四川中医, 2016, 34(10): 189-191.
- [75] 易越, 裴丽霞, 陈昊, 等. 针灸治疗反流性食管炎的选穴规律分析[J]. 中国针灸, 2020, 40(05): 557-564.
- [76] 吕慧娟, 张奇文, 张全爱. 麦粒灸四花穴治疗反流性食管炎案[J]. 中国针灸, 2021, 41(04): 420.
- [77] 高玮, 杜昕, 王洪博. 旋覆代赭汤加减联合穴位埋线对肝胃不和证反流性食管炎患者的临床疗效[J]. 中成药, 2021, 43(11): 3255-3257.
- [78] Sandhu D S, Fass R. Current Trends in the Management of Gastroesophageal

Reflux Disease[J]. Gut and Liver, 2018, 12(1): 7-16.

[79] 李影华, 苏冬梅, 白桦. 柴胡疏肝散加减治疗肝胃不和型反流性食管炎 98 例的临床观察[J]. 世界中医药, 2016, 11(08): 1437-1439.

[80] 陈昶洲, 张雯, 李熠萌, 等. 柴胡疏肝散联合质子泵抑制剂治疗胃食管反流病临床研究[J]. 安徽中医药大学学报, 2020, 39(02): 42-45.

[81] 曹云, 陈建新, 符欣, 等. 基于网络药理学探讨左金丸治疗反流性食管炎的作用机制[J]. 北京中医药, 2020, 39(09): 975-979.

[82] 储媛, 陈小芳, 徐惠明. 加味左金丸联合常规西药治疗肝胃郁热型反流性食管炎临床研究[J]. 新中医, 2021, 53(23): 63-66.

[83] 牛豫洁. 加味金铃子散治疗反流性食管炎 60 例疗效观察[J]. 河北中医, 2010, 32(10): 1492-1493.

[84] 辛国, 赵昕彤, 黄晓巍. 柴胡化学成分及药理作用研究进展[J]. 吉林中医药, 2018, 38(10): 1196-1198.

[85] 张静艳, 张晓杰. 柴胡皂苷对抑郁模型大鼠海马乙酰胆碱代谢及组织形态学影响的实验研究[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2011, 32(04): 506-508.

[86] 李陈雪, 杨玉赫, 冷德生, 等. 枳壳化学成分及药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(02): 158-161.

[87] Yi L T, Li C F, Zhan X, et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the flavonoid naringenin in mice[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2010, 34(7): 1223-1228.

[88] 施学骄, 张杰红, 樊丹青, 等. 枳实、枳壳挥发油化学成分及抑菌活性的比较研究[J]. 中药与临床, 2012, 3(02): 25-27.

[89] 谭珍媛, 邓家刚, 张彤, 等. 中药厚朴现代药理研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020: 1-5.

[90] Xue Z, Wu C, Wei J, et al. An orally administered magnololide A ameliorates functional dyspepsia by modulating brain-gut peptides and gut microbiota[J]. Life Sci, 2019, 233: 116749.

- [91] 周瑞, 项昌培, 张晶晶, 等. 黄连化学成分及小檗碱药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(19): 4561-4573.
- [92] 李皓翔, 梅全喜, 赵志敏, 等. 陈皮广陈皮及新会陈皮的化学成分药理作用和综合利用研究概况[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(6): 1460-1463.
- [93] 姜春兰, 蔡锦源, 梁莹, 等. 砂仁的有效成分及其药理作用的研究进展[J]. 轻工科技, 2020, 36(07): 43-45.
- [94] 闫瑶, 金美兰, 周磊, 等. 砂仁对抗生素所致肠道菌群失调小鼠调节作用的探讨[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(09): 1040-1043.
- [95] Leung W C, Zheng H, Huen M, et al. Anxiolytic-like action of orally administered dl-tetrahydropalmatine in elevated plus-maze[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2003, 27(5): 775-779.
- [96] Tianjiao L, Shuai W, Xiansheng M, et al. Metabolomics coupled with multivariate data and pathway analysis on potential biomarkers in gastric ulcer and intervention effects of Corydalis yanhusuo alkaloid[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e82499.
- [97] Wikoff W R, Anfora A T, Liu J, et al. Metabolomics Analysis Reveals Large Effects of Gut Microflora on Mammalian Blood Metabolites[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS, 2009, 106(10): 3698-3703.
- [98] 张园, 彭伯坚, 骆凤娇. 菌群变化及脂多糖对胃食管反流病和 Barrett 食管的影响[J]. 广东医学, 2015, 36(11): 1773-1775.
- [99] Gregersen H, Pedersen J, Drewes A M. Deterioration of Muscle Function in the Human Esophagus with Age[J]. Digestive diseases and sciences, 2008, 53(12): 3065-3070.
- [100] Dawsey S M, Fagundes R B, Jacobson B C, et al. Diet and esophageal disease[Z]. United States: Blackwell Publishing Ltd, 2014: 1325, 127-137.
- [101] Kubo A A, Corley D A D A, Jensen C D C D, et al. Dietary Factors and the Risks of Esophageal Adenocarcinoma and Barrett' s Esophagus[J]. Nutrition

research reviews, 2010, 23(2): 230-246.

[102] Imhann F, Bonder M J, Vich V A, et al. Proton pump inhibitors affect the gut microbiome[J]. Gut, 2016, 65(5): 740-748.

[103] Vogtmann E, Flores R, Yu G, et al. Association between tobacco use and the upper gastrointestinal microbiome among Chinese men[J]. Cancer Causes Control, 2015, 26(4): 581-588.

[104] Souza R F, Huo X, Mittal V, et al. Gastroesophageal Reflux Might Cause Esophagitis Through a Cytokine-Mediated Mechanism Rather Than Caustic Acid Injury[J]. Gastroenterology (New York, N. Y. 1943), 2009, 137(5): 1776-1784.

[105] 崔曼莉, 王景杰, 张明鑫. 微生态在食管疾病中的意义[J]. 世界华人消化杂志, 2018, 26(05): 289-295.

[106] 王鑫国. 中药药理学实验教程[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2017.

[107] Masuda T, Yano F, Omura N, et al. Effect of Low-Dose Aspirin on Chronic Acid Reflux Esophagitis in Rats[J]. Dig Dis Sci, 2018, 63(1): 72-80.

[108] 段冰霞, 陈宏慈, 徐安, 等. 食管宁复方中药汤剂对反流性食管炎的治疗效果: 大鼠模型研究[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2021, 20(08): 615-620.

[109] SM D S, LB C, BS Y, et al. Microbiome and Gastroesophageal Disease : Pathogenesis and Implications for Therapy[J]. Ann Clin Gastroenterol Hepatol, 2020, 4: 22-33.

[110] 余英, 张杰, 高峰, 等. 反流性食管炎严重程度与食管黏膜菌群结构变化的关系初探[J]. 中国医药, 2019, 14(10): 1519-1523.

[111] Scholz H C, Tomaso H, Dahouk S A, et al. Genotyping of *Ochrobactrum anthropi* by recA-based comparative sequence, PCR-RFLP, and 16S rRNA gene analysis[J]. FEMS microbiology letters, 2006, 257(1): 7-16.

[112] 丁俊荣, 张秋香, 刘小鸣, 等. 江苏无锡健康与肠病人群肠道脱硫弧菌数量及肠道菌群多样性[J]. 微生物学报, 2012, 52(08): 1033-1039.

[113] Figliuolo V R, Coutinho-Silva R, Coutinho C. Contribution of

sulfate-reducing bacteria to homeostasis disruption during intestinal inflammation[J]. Life Sci, 2018, 215: 145-151.

[114] Muyzer G, Stams A J. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria[J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(6): 441-454.

[115] Bisson-Boutelliez C, Massin F, Dumas D, et al. Desulfovibrio spp. survive within KB cells and modulate inflammatory responses[J]. Mol Oral Microbiol, 2010, 25(3): 226-235.

[116] van Muijlwijk G H, van Mierlo G, Jansen P, et al. Identification of Allobaculum mucolyticum as a novel human intestinal mucin degrader[J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1966278.

[117] Beckmann L, Kunstner A, Freschi M L, et al. Telmisartan induces a specific gut microbiota signature which may mediate its antiobesity effect[J]. Pharmacol Res, 2021, 170: 105724.

[118] Cox L M, Yamanishi S, Sohn J, et al. Altering the Intestinal Microbiota during a Critical Developmental Window Has Lasting Metabolic Consequences[J]. Cell, 2014, 158(4): 705-721.

[119] Miyauchi E, Kim S W, Suda W, et al. Gut microorganisms act together to exacerbate inflammation in spinal cords[J]. Nature, 2020, 585(7823): 102-106.

[120] Rizzatti G, Lopetuso L R, Gibiino G, et al. Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases[J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 9351507.

[121] Hotamisligil G S. Inflammation and metabolic disorders[J]. Nature, 2006, 444(7121): 860-867.

[122] Cani P D, Amar J, Iglesias M A, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance[J]. Diabetes, 2007, 56(7): 1761-1772.

[123] Cani P D, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity

and diabetes in mice[J]. *Diabetes*, 2008, 57(6): 1470-1481.

[124] Sen T, Cawthon C R, Ihde B T, et al. Diet-driven microbiota dysbiosis is associated with vagal remodeling and obesity[J]. *Physiol Behav*, 2017, 173: 305-317.

[125] Larsen N, Vogensen F K, van den Berg F W, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults[J]. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9085.

[126] Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes[J]. *Nature*, 2012, 490(7418): 55-60.

[127] 余英, 高峰, 张杰. 反流性食管炎治疗效果与食管下段菌群构成变化的关系研究[J]. *首都医科大学学报*, 2020, 41(02): 243-248.

[128] Meloni M, Buratti P, Carrierio F, et al. In Vitro Modelling of Barrier Impairment Associated with Gastro-Oesophageal Reflux Disease (GERD) [J]. *Clin Exp Gastroenterol*, 2021, 14: 361-373.

[129] Yin X L, Zhong L, Lin C Y, et al. Tojapride Reverses Esophageal Epithelial Inflammatory Responses on Reflux Esophagitis Model Rats[J]. *Chin J Integr Med*, 2021, 27(8): 604-612.

[130] Orlando R C. Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2008, 42(5): 584-588.

[131] Dunbar K B, Agoston A T, Odze R D, et al. Association of Acute Gastroesophageal Reflux Disease With Esophageal Histologic Changes[J]. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 2016, 315(19): 2104-2112.

[132] Lv J, Guo L, Liu J J, et al. Alteration of the esophageal microbiota in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(18): 2149-2161.

[133] Isomoto H, Saenko V A, Kanazawa Y, et al. Enhanced expression of interleukin-8 and activation of nuclear factor kappa-B in endoscopy-negative

- gastroesophageal reflux disease[J]. *Am J Gastroenterol*, 2004, 99(4): 589-597.
- [134] O'Riordan J M, Abdel-latif M M, Ravi N, et al. Proinflammatory cytokine and nuclear factor kappa-B expression along the inflammation-metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus[J]. *Am J Gastroenterol*, 2005, 100(6): 1257-1264.
- [135] Oh T Y, Lee J S, Ahn B O, et al. Oxidative damages are critical in pathogenesis of reflux esophagitis: implication of antioxidants in its treatment[J]. *Free Radic Biol Med*, 2001, 30(8): 905-915.
- [136] Fitzgerald R C, Onwuegbusi B A, Bajaj-Elliott M, et al. Diversity in the oesophageal phenotypic response to gastro-oesophageal reflux: immunological determinants[J]. *Gut*, 2002, 50(4): 451-459.
- [137] Colleypriest B J, Ward S G, Tosh D. How does inflammation cause Barrett's metaplasia?[J]. *Current opinion in pharmacology*, 2009, 9(6): 721-726.
- [138] Lee J S, Oh T Y, Ahn B O, et al. Involvement of oxidative stress in experimentally induced reflux esophagitis and Barrett's esophagus: clue for the chemoprevention of esophageal carcinoma by antioxidants[J]. *Mutat Res*, 2001, 480-481: 189-200.
- [139] Konturek P C, Nikiforuk A, Kania J, et al. Activation of NFkappaB represents the central event in the neoplastic progression associated with Barrett's esophagus: a possible link to the inflammation and overexpression of COX-2, PPARgamma and growth factors[J]. *Dig Dis Sci*, 2004, 49(7-8): 1075-1083.
- [140] Abdel-Latif M M, Kelleher D, Reynolds J V. Potential role of NF-kappaB in esophageal adenocarcinoma: as an emerging molecular target[J]. *J Surg Res*, 2009, 153(1): 172-180.
- [141] Al-Sadi R, Ye D, Said H M, et al. IL-1beta-induced increase in

intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by MEKK-1 activation of canonical NF-kappaB pathway[J]. Am J Pathol, 2010, 177(5): 2310-2322.

[142] Suzuki T, Yoshinaga N, Tanabe S. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium[J]. J Biol Chem, 2011, 286(36): 31263-31271.

[143] Van Itallie C M, Anderson J M. Claudins and epithelial paracellular transport[J]. Annu Rev Physiol, 2006, 68: 403-429.

[144] Will C, Fromm M, Muller D. Claudin tight junction proteins: novel aspects in paracellular transport[J]. Perit Dial Int, 2008, 28(6): 577-584.

[145] Van Itallie C M, Anderson J M. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition[J]. Semin Cell Dev Biol, 2014, 36: 157-165.

[146] Webb P G, Spillman M A, Baumgartner H K. Claudins play a role in normal and tumor cell motility[J]. BMC cell biology, 2013, 14(1): 19.

附录一 综 述

胃食管反流病现代医学研究进展

胃食管反流病(Gastroesophageal Reflux Disease, GERD)根据胃镜表现可分为三种临床类型:非糜烂性反流病(non-erosive reflux diseases, NERD),即内镜检查阴性的GERD;反流性食管炎(reflux esophagitis, RE),是指内镜下可见食管黏膜破损的GERD;Barrett食管(Barrett's esophagitis, BE),是指食管下段的复层鳞状上皮被单层柱状上皮取代^[1, 2]。GERD以反复发作的烧心和反流为典型症状;可出现胸痛、上腹痛、腹胀、嗝气等不典型症状,其中胃食管反流所致的胸痛症状可与心绞痛相似,需要与心源性胸痛相鉴别;此外,还可伴随慢性咳嗽、支气管哮喘、吞咽困难、咽部异物感、咽喉炎、牙蚀症等食管外症状^[1, 3, 4]。GERD临床症状多样,且复发率高,需要反复就诊并进行长期或间断药物维持治疗,严重影响民众健康及生活质量,且造成了沉重的经济负担,已引起国内外医学界的广泛关注和重视。

1 流行病学研究及危险因素

全球大量流行病学研究发现,GERD的患病率近几十年来逐渐上升,现已成为最常见的慢性病之一^[5],但该病的患病率在不同国家、不同地区之间有着明显的差异。一项系统回顾显示,GERD的患病率在北美为18.1%-27.8%,在欧洲为8.8%-25.9%,在东亚为2.5%-7.8%,在中东为8.7%-33.1%,在澳大利亚为11.6%,在南美为23.0%^[6]。在国内,1996年潘国宗等对北京、上海两市成人GERD的患病率进行了调查,结果显示两市GERD的患病率为5.77%,RE患病率为1.92%^[7]。2007年章宏等对浙江省10个地级市医院内科门诊患者进行的一项流行病学调查显示,GERD初筛患病率为7.28%^[8]。2020年国内一项基于社区人群GERD患病率的Meta分析显示,中国社区人群GERD患病率为7.69%,其中区域患病率

最高的是西北地区，为 8.99%，患病率最低的是华东地区，为 5.88%，总体呈现西高东低趋势^[9]。综上可知，GERD 在北美、欧洲地区患病率较高，东亚地区患病率低于欧美地区，我国目前缺少全国性大规模的 GERD 流行病学调查，该病在我国整体患病情况尚不明确，但也呈逐年上升趋势。

据国内外相关报道，GERD 公认的危险因素包括吸烟、肥胖，其他因素包括年龄（ ≥ 50 岁）、饮酒、饮食习惯（如嗜食酸性、辛辣食物，高碳水化合物饮食，高脂肪饮食等）、生活习惯（如饭后平躺）、非甾体抗炎药和（或）阿司匹林等药物的使用、遗传因素、精神心理因素、文化程度或低收入等^[10-20]。

2 发病机制

现代医学认为，GERD 是由多种因素共同作用所导致的胃食管动力障碍性疾病，其发病机制涉及多个方面，主要包括：抗反流防御屏障功能的减弱、反流物对食管黏膜的攻击作用增强、胃排空延迟、食管高敏感、精神心理因素、遗传因素等^[21]。而近年来，消化道微生态的改变在 GERD 的发病中的作用也逐渐受到重视^[22]。

2.1 抗反流防御机制减弱

2.1.1 食管下括约肌功能异常

抗反流屏障是指食管胃连接处（esophagogastric junction, EGJ），其解剖结构包括食管下括约肌（lower esophageal sphincter, LES）、膈肌脚、膈食管膜、腹段食管、食管和胃底间的锐角（His 角）等，任一结构形态和功能的缺陷均可导致抗反流能力下降，引起 GERD 的发病^[23, 24]。EGJ 作为抗反流的第一道防线，其中最为重要的结构是 LES，LES 在静息时处于收缩状态并维持一定的压力，可防止胃内容物反流至食管。有研究证实，GERD 患者食管下括约肌静息压力（lower esophageal sphincter pressure, LESP）明显低于健康人^[25]，LESP 降低导致食管胃共腔是 GERD 发病最根本的原因之一^[26]。Matthias P 等^[27]研究显示，LES 的长度缩短以及 LESP 的降低可导致 LES 抗反流功能受损，而 LES 的受损程度与食管酸

暴露的程度呈正相关。在非吞咽情况下 LES 持续性松弛超过 10s 或者更长时间被称为一过性食管下括约肌松弛 (transient lower esophageal sphincter relaxation, TLESR), TLESR 与反流的发生也有着密切联系。有研究显示^[28], 大多数反流事件发生在 TLESR 期间, 而不是在持续较低的 LES 期间。Roman 等^[29]通过研究发现, TLESR 的发生可能与膈肌的抑制有关, 并认为 TLESR 是导致轻中度 GERD 患者发生酸反流的重要机制之一。

2.1.2 食管裂孔疝

食管裂孔疝 (Hiatus Hernia, HH) 是腹腔器官因各种原因经过膈食管裂孔进入胸腔所致的疾病^[30]。食管裂孔疝破坏了食管胃连接处的正常结构, 通过多种机制导致 GERD 的发生。膈脚在 LES 近端 2cm 处环绕 LES, 正常情况下, 在腹压升高和深吸气的时候, 膈脚的收缩会使 LES 的压力增加, 可以代偿食管胃之间的压力梯度来发挥抗反流屏障作用^[31]。但当出现食管裂孔疝时, LES 和膈脚分离了, 两者协同抗反流作用下降, 不能维持 LES 高压带, 增加了反流发生的概率。此外, HH 患者食管胃连接处的横断面积增加, 也使其有更大的空间让胃内容物发生反流^[32]。膈食管膜结构功能的完整对于抗反流也有重要意义, 可对食管下段起到固定作用, 使胃食管角保持为锐角, 从而减少反流的发生^[33]。而 HH 患者膈食管膜受到过分牵拉, 可致其萎缩并丧失抗反流的功能。此外, HH 患者餐后胃酸袋变大, 逃脱了食物的缓冲, 充当了反流的胃酸储存库, 导致在吞咽时因 LES 的松弛而出现反流^[34]。

2.1.3 食管廓清功能障碍

当反流物进入食管后, 食管廓清功能成为了抗反流的主要防线, 其包括容量清除和化学清除, 主要通过食管的物理蠕动和分泌化学物质来实现^[32]。

容量清除是指反流物刺激食管蠕动, 推动反流物的排空, 减少反流物对食管黏膜的损伤。当食管运动功能降低或者出现病理性运动时, 不能及时有效的清除反流物, 食管酸暴露时间延长, 可引发甚至加重食管黏膜的

损伤。Kahrilas 等^[35]研究报道, GERD 患者的食管存在无效食管运动 (ineffective esophageal motility, IEM), 胡志伟等^[36]研究也指出, 食管动力障碍越严重, 食管损伤程度就越高。但是, 也有研究结果与上述结论相悖的情况, 认为 IEM 的发生率在健康者与 GERD 患者之间没有明显差异, 食管炎的严重程度与 IEM 无关^[37]。也有研究表明, 反流引起的食管炎症可以使食管体部蠕动功能减弱^[38]。因此, GERD 患者虽然存在食管运动功能障碍的事实, 但与 GERD 之间的因果关系尚存在争议。

食管的化学清除能力与唾液的量、成分及运输能力有关。当反流物进入食管后, 会诱导唾液分泌, 刺激食管发生蠕动, 从而提高食管的廓清能力^[25]。唾液中的碳酸氢盐可以中和食管中的酸性反流物, 唾液的分泌量减少, 会引起食管酸暴露时间延长, 食管炎发病率增高。有研究指出, 与健康者相比, GERD 患者唾液的分泌量和 pH 值都偏低, 而应用 PPI 治疗后 GERD 患者唾液的分泌量及 pH 值虽有所提高, 但仍比健康者低^[39]。唾液中所含的表皮生长因子等物质可促进受损食管黏膜的修复, 但在一组对照研究中发现, 咽喉反流患者唾液中表皮生长因子的含量远低于正常人, 表明 GERD 患者的唾液腺功能可能较正常人有所下降^[40]。同时还有研究指出, 食管主要依靠食管蠕动将唾液快速移送至食管下段, 但 GERD 患者咽喉及上段食管的平均唾液移动分数与正常人相比明显降低^[41]。

2.1.4 食管黏膜屏障功能受损

食管黏膜屏障是抗反流防御机制之一, 其中上皮防御屏障主要由多层鳞状上皮细胞膜以及细胞之间的紧密连接组成, 可阻止 H^+ 进入细胞内, 缓冲或清除已经进入细胞内的 H^+ , 从而保护食管黏膜^[42]。有研究发现, GERD 患者食管上皮细胞间紧密连接结构遭到破坏, 使细胞通透性增加, 上皮细胞间隙增宽, 食管黏膜上皮防御屏障功能受损^[43]。胃酸、胃蛋白酶等损害因子有机会渗透至黏膜下对食管造成进一步损伤, 同时刺激食管神经末梢, 引起烧心, 胸痛等不适症状^[44]。

2.2 反流物的攻击

传统的观点认为食管损伤是由胃和十二指肠的反流物质直接作用于食管黏膜造成的化学损伤。反流物中的胃酸和胃蛋白酶可以损伤食管黏膜,当胃内 pH 值小于 4.0 时,胃蛋白酶被激活,pH 值越低,酸暴露时间越长,黏膜损伤越重,反流、烧心的症状也越重。反流物中还可混合胆汁、胰酶等物质。酸和胆酸在食管黏膜的损害中可能存在正性协同作用^[42]。

而近来诸多研究指出,反流物最早是通过诱导炎症因子的过度表达对食管黏膜进行攻击,而不是通过反流物的直接化学腐蚀作用损伤食管。研究指出,未与反流物接触的近端食管黏膜也可以见到非糜烂性反流病相关的病理变化,并被证实与胃食管反流物在早期诱导的炎症反应密切相关^[45, 46]。Dumbar 等研究急性 RE 患者早期食管组织学的改变发现,黏膜上皮细胞尚未损伤时,病变部位就出现了食管炎症反应,主要表现为 T 细胞的浸润,并伴有固有层乳头的延伸,这表明 GERD 最早是从上皮内的炎症反应开始发生病变的,而并非食管黏膜表层的化学腐蚀^[47]。

2.3 胃排空延迟

胃排空延迟可使胃内残留食物增加、胃腔和食管下段间的静息压梯度增高,当压力超过胃食管连接处抗反流屏障的压力可能会导致反流的概率增加,Penagini 等^[48]研究发现 GERD 患者比健康者可观察到更频繁的胃排空延迟。而也有学者指出胃排空延迟与食管酸暴露之间未见明显相关性^[49]。因而胃排空延迟在 GERD 发病机制中的作用尚不能明确。

2.4 食管高敏感

部分患者即使在正常生理范围内的酸反流刺激下,也会出现烧心等症状,这部分患者的食管表现出了高度的敏感性,其诱因包括了化学刺激(例如胃酸)、内在刺激(例如压力)、机械刺激(例如球囊扩张)、温度刺激(例如冷热流体)等,其机制可能与外周及脊髓、大脑中枢敏感化有关。有学者研究发现,食管内输注酸性溶液后,对 GERD 患者食管酸暴露部位进行电刺激和化学刺激,患者食管的敏感性增强,且疼痛阈值下降,这表明烧心症状的出现可能与食管高敏感有关^[50]。

2.5 精神心理因素、遗传因素

随着对 GERD 研究的深入,精神心理因素在 GERD 发病中的作用也受到越来越多的重视。有研究认为,焦虑、抑郁、心理压力大等因素与 GERD 的患病呈正相关^[10]。Kessing 等^[51]通过一项前瞻性研究发现,GERD 患者的焦虑水平与反流发生的频率和症状的严重程度呈正比。但以上研究都未探讨焦虑和抑郁与 GERD 之间的因果关系。

有研究表明,遗传因素是 GERD 的独立危险因素,并且已经有一些研究发现了与 GERD 有关联的目标基因^[10]。有研究发现,位于 2 号染色体的 III 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链在家庭 GERD 传播中占主导地位,和儿童 GERD、成人 GERD 的发生都有显著相关性^[52]。Patel 等^[53]在研究中发现,GERD 患者个体间存在反流症状的差异性,差异的出现和遗传因素有关,而 GERD 在家族遗传方面与 $\beta 2$ 肾上腺素能受体的遗传多态性有关。

2.6 消化道微生态

2.6.1 GERD 与小肠细菌过度生长

姚佳等对 RE 患者和健康体检者的小肠细菌生长情况进行了研究,结果发现,与健康体检者相比,RE 患者中合并小肠细菌过度生长(SIBO)的比例显著升高,而合并小肠细菌过度生长的 RE 患者口盲传输时间明显延长,这可能导致 RE 患者胃肠动力障碍的加重^[54]。Revaiah 等^[55]对使用 PPI 和使用 PPI 联合促动力药的患者进行观察,发现在使用 PPI 联合促动力药可通过增强肠道蠕动降低 SIBO 的风险,并可能降低与长期使用 PPI 相关的 SIBO 风险;同时指出,合并 SIBO 后,小肠内细菌增殖会增加肠腔内的代谢,造成小肠内气体滞留,影响小肠的运动功能,而小肠运输延迟会导致胃的排空延迟,从而加重食管反流。Belei 等^[56]研究发现,使用 PPI 治疗 3 个月后,31.3% 的 GERD 患儿合并了 SIBO,而正常对照组中仅 5.0% 存在 SIBO,这一患病率具有显著差异($P < 0.001$)。金玲肖等^[57]也对服用 PPI 的患者和健康志愿者小肠细菌过度生长的情况进行了对照观察,结果显示服用 PPI 的患者合并 SIBO 的概率较健康志愿者显著升高($P <$

0.01), 并且 PPI 的用药时间与发生 SIBO 的概率呈正相关。王洪艳^[57]进行了一项针对 PPI 联合益生菌治疗 RE 的临床研究, 结果显示, 单用 PPI 组及 PPI 联用益生菌组的 SIBO 的发病率较治疗前菌明显升高, 其中单用 PPI 治疗后 SIBO 的发病率达到 43.6%, 而 PPI 联合益生菌组的 SIBO 的发病率为 24.7%, 这两组发病率的比较具有显著差异 ($P < 0.05$), 表明益生菌的使用可显著降低 SIBO 的发生率, 并且联用组的 RE 复发率较单用组显著降低 ($P < 0.05$), 提示 SIBO 的发生率的降低可能与复发率的降低有一定的关联。

2.6.2 GERD 与远端肠道微生态

有研究发现, RE 患者合并了肠道菌群的紊乱, 主要表现为肠道菌群的多样性降低、菌群的种类减少、菌群分布不均, 同时粪便中短链脂肪酸 (SCFA) (肠道菌群重要的代谢产物) 水平也降低^[59]。有学者对 GERD 与肠易激综合征重叠症患者运用益生菌制剂进行治疗, 观察其临床疗效, 结果显示 GERD 患者肠道菌群失调改善后, 其反酸、烧心、胸骨后疼痛等症状也都得到了明显缓解^[60]。然而, 目前关于 GERD 与远端肠道微生态直接相关性的研究报道较少。GERD 患者远端肠道微生态的是否存在特征性改变, 益生菌调节肠道微生态是否能对 GERD 起到治疗作用以及如何起作用, 还需要深入挖掘探索。

2.6.3 GERD 与胃、食管微生态

有学者对反流性食管炎严重程度与食管黏膜菌群结构变化的关系进行了研究, 结果发现不同程度 RE 患者食管下段黏膜菌群构成与健康人群相比存在明显差异, 还发现所有 RE 患者中 Hp 阳性率 (15.6%) 明显低于健康对照组 (47.1%)^[61]。Mitsushige Sugimoto 等^[62]关于 Hp 根除治疗和 RE 之间关系的 Meta 分析显示, 根除幽门螺杆菌会增加反流性食管炎的风险。有研究^[63]发现部分合并 Hp 感染的 GERD 患者食管蠕动增强, 食管下括约肌压力升高, 减少了食管酸暴露, 推测 Hp 感染对于 GERD 来说可能是一个保护因素。余英等^[64]对 RE 治疗效果与食管下段菌群构成变化的关系进

行了研究,结果显示 PPI 治疗反流性食管炎的治疗效果与食管下段黏膜菌群构成变化相关,RE 愈合组患者食管黏膜中的乳杆菌属、双歧杆菌属等有益菌的丰度较治疗前明显增高。双歧杆菌和乳杆菌制剂已经较多的应用到多种疾病的治疗中,它们发挥作用的机制可能包括:参与合成多种酶、氨基酸和维生素,起到营养作用;具有免疫调节特性,保护宿主免受感染及其产生的异常炎性反应的影响;增强黏膜屏障功能等^[65-68]。该研究还发现 RE 患者愈合组的螺杆菌属丰度明显高于治疗前,而愈合不良组治疗前后螺杆菌属没有出现明显改变,因该研究中所有 RE 患者治疗前幽门螺杆菌均检测为阴性,因而螺杆菌属中可能存在 RE 的保护因素。

3 GERD 的治疗

GERD 的治疗以缓解患者临床症状,减轻食管炎症,预防食管并发症的发生为目标。

3.1 患者教育

生活方式及饮食习惯的调整是 GERD 治疗干预的基石。具体内容包括:(1)戒烟,禁酒;(2)避免巧克力、咖啡、浓茶、柑橘汁或辛辣刺激等饮食,避免过量肉食、减少高脂肪食物摄入;(3)减少引起腹压增高的因素:如肥胖、便秘、紧束腰带等;(4)进餐后不宜立即卧床;避免在睡前 3 小时内进餐,并可将床头抬高 15-20cm;(5)改善睡眠质量,减少睡眠障碍与 GERD 的相互促进作用等。医生应该根据患者的个人情况推荐个性化的生活方式调整,避免一长串的建议^[6]。

3.2 药物治疗

3.2.1 西药治疗

改变了生活方式,但仍有令人烦恼的 GERD 相关症状的患者,通常给与药物治疗。药物治疗包括质子泵抑制剂(PPI)、钾竞争性酸阻滞剂(PCAB)、组胺 H₂ 受体拮抗剂(H₂RA)、促胃肠动力药、抗酸药等。

PPI 被认为是治疗 GERD 最有效的药物,也是首选药物,因为它具有深刻而稳定的抑酸作用。几项大规模研究表明^[69],PPI 治疗对 EE 和 NERD

患者的症状缓解均优于 H₂RA 治疗,而且 PPI 和 H₂RAs 或 PPI 和安慰剂之间的不良事件发生率在统计学上没有显著差异。PPI 单剂量治疗效果不理想时可加大剂量改为双倍,某一种 PPI 治疗没有效果可尝试换用其他种类的 PPI, PPI 使用疗程应至少为 8 周^[1]。持续 PPI 治疗与按需治疗或间歇治疗的价值仍然存在争议。有几项研究报告指出,持续治疗比按需治疗产生更大的患者满意度。然而,已有其他研究证实,在轻度 GERD 患者中,按需治疗优于持续治疗,因为它成本更低,缓解了人们对长期使用 PPI 的担忧,总体患者满意度很高^[6]。而近年来,有大量报道指出由于长期使用 PPI 治疗而产生的各种副作用,如营养缺乏(镁、维生素 B12)、胃肠炎风险增加、艰难梭菌结肠炎、骨质疏松和骨折、缺血性心脏病、慢性肾脏损伤和痴呆症等。有数据指出,在接受 PPI 治疗的患者中,继发于急性间质性肾炎的慢性肾功能障碍的发生率增加。每天服用两次比每天服用一次风险更高。还有一项大型前瞻性队列研究显示,与未接受 PPI 治疗的患者相比,接受 PPI 治疗的患者患痴呆症的风险显著增加。因为几乎所有报告这些副作用的研究都是基于人群的,所以还不清楚前述的回顾性报告是否会在前瞻性试验中得到证实。无论如何,患者应接受控制其症状的最低剂量的 PPI,应定期评估慢性 PPI 治疗的必要性,并应在 PPI 相关不良事件的高风险患者中寻找慢性 PPI 治疗的替代方案^[6]。

3.2.2 中药治疗

近年来,中医药对 GERD 的认识不断深入,治疗 GERD 的优势也逐渐凸显,主要表现在症状的改善、疗程的缩短及降低复发率等方面。而据临床观察显示中西药结合更能优势互补,获益良多,中药复方联合西药治疗 GERD 已成为目前国内不容忽视的重要力量^[70]。

多项以柴胡疏肝散合左金丸加减为治疗组、PPI 为对照组的临床研究^[71-73]均表明:中药组不仅对反酸、烧心等典型症状的改善优于对照组,而且对情志异常、GERD 相关性胸痛、胃镜下黏膜的改善也优于对照组。多项以六君子汤加减进行治疗临床研究^[74, 75]表明:大黄香砂六君子汤治疗

GERD 的有效率与西药治疗相比明显升高, 并且具有症状缓解快、复发率低等特点。陈世旺等^[76]通过 Meta 分析发现: 半夏厚朴汤单用或者与西药联用治疗 GERD 与单纯西药相比, 在提高有效率和降低复发率方面均具有显著优势。针对半夏厚朴汤治疗 GERD 临床疗效的研究^[77, 78]表明: 半夏厚朴汤对于痰气交阻型 GERD 有良好的治疗效果, 有效率达到 90% 以上。陈家坤等^[79]运用 Meta 分析评价半夏泻心汤治疗 GERD 的疗效, 证实半夏泻心汤的疗效优于单纯西药治疗, 中药和西药两种治疗方法在胃镜改善和安全性方面无明显差异。赵东梅^[80]等运用半夏厚朴汤联合 PPI 治疗 RE, 发现中西药联用组患者血清 PPAR γ 、HIF-1 α 水平治疗后比治疗前明显降低, 而单纯西药组治疗前后这上述指标未见明显变化, 表明半夏厚朴汤可能通过下调 PPAR γ 及 HIF-1 α 的表达, 改善食道黏膜炎症状态下的缺氧微环境, 从而达到治疗 RE 的目的。中药复方联合现代西药的临床研究较多, 但绝大部分却缺乏作用机制的探讨, 今后应将其作为研究重点。

3.3 非药物治疗

部分经药物治疗后效果不佳的患者, 可采取外科手术或内镜治疗。目前有几种外科技术可用于 GERD 的治疗, 其中腹腔镜胃底折叠术是目前最常用的手术方法, 而有数据支持将腹腔镜后路手术作为胃食管反流病的首选手术治疗的 1a 级支持, 腹腔镜前路手术后烧心发生率高、PPI 使用率高、再手术率高^[6]。然而, 最近的一项研究表明, 美国外科胃底折叠术的使用率迅速下降, 降至 2004 年的水平^[81]。在过去的 20 多年里, 研究人员一直致力于 GERD 腔内治疗方法的开发。与外科胃底折叠术相比, 内镜技术侵袭性更小, 安全性更高, 目的是达到相似的有效率。此外, 对于 GERD 的 PPI 或其他口服药物的依赖也减少了。内镜治疗手段主要包括射频治疗、注射或植入技术及经内镜腔内胃食管成形术, 其治疗 GERD 的长期有效性还有待进一步证实。GERD 领域的药物开发的未来方向已经明显下降, 这是因为人们总体上认为没有其他药物可以超过 PPI。与此同时, GERD 仍有许多需求未得到满足的领域, 为药物开发提供了独特的机遇。此外, 越来越多的关

于长期PPI治疗的不同不良事件的报道促使患者寻求替代治疗方案。因此，腔内治疗GERD和抗反流外科技术可能会引起患者的兴趣，这可能会促使新的微创非药物干预措施的进一步发展。

4 总结

胃食管反流病的发病率在逐年增加，临床表现十分复杂，发病机制涉及多个方面，对 GERD 发病机制的研究对其诊治有着重要意义。在治疗方面，药物治疗目前仍然是首选方案，但常用药的副作用越发明显，同时还存在一定疗效上的问题；腹腔镜手术或内镜治疗提供了新的非药物治疗途径，也有一定的效果，但长期疗效有待进一步证实；中医药治疗 GERD 的有效性已经得到了广泛的认可，但也存在缺乏规范化诊疗等问题。但总的来说，不管是中医药还是西药等方法，都应成为今后研究和探索治疗 GERD 的重点，而将中医药理论与治疗方案和现代的医学技术紧密结合起来的研究也将会是今后的重中之重。

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(03): 221-226.
- [2] Katz P O, Gerson L B, Vela M F. Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease[J]. Am J Gastroenterol, 2013, 108(3): 308-328, 329.
- [3] Richter J E, Rubenstein J H. Presentation and Epidemiology of Gastroesophageal Reflux Disease[J]. Gastroenterology, 2018, 154(2): 267-276.
- [4] 张声生, 朱生樑, 王宏伟, 等. 胃食管反流病中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2017, 25(05): 321-326.
- [5] Herregods T V K, Bredenoord A J, Smout A J P M. Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease: new understanding in a new era[J]. Neurogastroenterology & Motility, 2015, 27(9): 1202-1213. [6] Sandhu D S, Fass R. Current Trends in the Management of Gastroesophageal Reflux Disease[J]. Gut and Liver, 2018, 12(1): 7-16.
- [7] 潘国宗, 许国铭, 郭慧平. 北京上海胃食管反流症状的流行病学调查[J]. 中华消化杂志, 1999, 19(4): 223.
- [8] 章宏, 徐晶, 厉有名, 等. 浙江省内科门诊人群胃食管反流病及危险因素流行病学调查[J]. 中华消化杂志, 2007, 27(7): 443-446.
- [9] 周金池, 赵曙光, 王新, 等. 中国部分地区基于社区人群胃食管反流病患率 Meta 分析[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2020, 29(9): 1012-1020.
- [10] 俞亚转, 孙晓宁. 胃食管反流病患影响因素的研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2019, 28(10): 1174-1178.
- [11] Eusebi L H, Ratnakumaran R, Yuan Y, et al. Global prevalence of, and risk factors for, gastro-oesophageal reflux symptoms: a meta-analysis[J]. Gut, 2018, 67(3): 430-440.

- [12] Kumar S, Sharma S, Norboo T, et al. Population based study to assess prevalence and risk factors of gastroesophageal reflux disease in a high altitude area[J]. Indian Journal of Gastroenterology, 2011, 30(3): 135-143.
- [13] Sethi S, Richter J E. Diet and gastroesophageal reflux disease: role in pathogenesis and management[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2017, 33(2): 107-111.
- [14] Asl S F, Mansour-Ghanaei F, Samadi H, et al. Evaluations of life style factors and the severity of Gastroesophageal reflux disease; a case-control study[J]. Int J Mol Epidemiol Genet, 2015, 6(1): 27-32.
- [15] Wu K, Kuo C, Yao C, et al. The effect of dietary carbohydrate on gastroesophageal reflux disease[J]. Journal of the Formosan Medical Association, 2018, 117(11): 973-978.
- [16] Matar Alsulobi A, Mohamed Abo El-Fetoh N, Ghazi Eid Alenezi S, et al. Gastroesophageal reflux disease among population of Arar City, Northern Saudi Arabia[J]. Electronic Physician, 2017, 9(10): 5499-5505.
- [17] Ness-Jensen E, Lagergren J. Tobacco smoking, alcohol consumption and gastro-oesophageal reflux disease[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2017, 31(5): 501-508.
- [18] Okuyama M, Takaishi O, Nakahara K, et al. Associations among gastroesophageal reflux disease, psychological stress, and sleep disturbances in Japanese adults[J]. Scandinavian journal of gastroenterology, 2016, 52(1): 44-49.
- [19] 金立鹏, 魏良洲. 从心身角度认识胃食管反流病[J]. 中华诊断学电子杂志, 2016, 4(03): 173-176.
- [20] Kessing B F, Bredenoord A J, Saleh C M G, et al. Effects of Anxiety and Depression in Patients With Gastroesophageal Reflux Disease[J]. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2015, 13(6): 1089-1095.

- [21] 吴菁, 张军. Barrett 食管的上消化道动力异常[J]. 胃肠病学, 2017, 22(10): 623-626.
- [22] Yang L, Lu X, Nossa C W, et al. Inflammation and Intestinal Metaplasia of the Distal Esophagus Are Associated With Alterations in the Microbiome[J]. Gastroenterology, 2009, 137(2): 588-597.
- [23] Menezes M A, Herbelli F. Pathophysiology of Gastroesophageal Reflux Disease[J]. World J Surg, 2017, 41(7): 1666-1671.
- [24] 刘霞, 王红, 王玲, 等. 胃食管反流病患者食管胃连接处形态及力学研究进展[J]. 山东医药, 2017, 57(34): 106-109.
- [25] 魏从光, 魏晓艳, 郝润春. 胃食管反流病的临床研究进展[J]. 武警医学, 2020, 31(06): 542-545.
- [26] 高玉静, 王潇潇, 王巍峰, 等. 食管远端与近端酸反流患者的食管动力特点分析[J]. 解放军医学院学报, 2016, 37(7): 754-757.
- [27] Paireder M, Kristo I, Asari R, et al. Electrical lower esophageal sphincter augmentation in patients with GERD and severe ineffective esophageal motility—a safety and efficacy study[J]. Surgical Endoscopy, 2019, 33(11): 3623-3628.
- [28] Herregods T V K, Bredenoord A J, Smout A J P M. Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease: new understanding in a new era[J]. Neurogastroenterology & Motility, 2015, 27(9): 1202-1213.
- [29] Roman S, Holloway R, Keller J, et al. Validation of criteria for the definition of transient lower esophageal sphincter relaxations using high-resolution manometry[J]. Neurogastroenterology & Motility, 2017, 29(2): e12920.
- [30] Seo H S, Choi M, Son S, et al. Evidence-Based Practice Guideline for Surgical Treatment of Gastroesophageal Reflux Disease 2018[J]. Journal of Gastric Cancer, 2018, 18(4): 313.

- [31] Gordon C, Kang J Y, Neild P J, et al. The role of the hiatus hernia in gastro-oesophageal reflux disease[J]. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2004, 20(7): 719-732.
- [32] 贾宁, 唐艳萍, 李杨. 现代医学对胃食管反流病研究机制进展[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2020, 26(01): 179-183.
- [33] 陈中献, 胡廷泽, 韦福康, 等. 膈食管膜结构及其在抗反流屏障中的作用[J]. *中华小儿外科杂志*, 1998, (06): 3-5.
- [34] Boeckxstaens G E, Rohof W O. Pathophysiology of Gastroesophageal Reflux Disease[J]. *Gastroenterology Clinics of North America*, 2014, 43(1): 15-25.
- [35] Kahrilas P J, Bredenoord A J, Fox M, et al. The Chicago Classification of esophageal motility disorders, v3.0[J]. *Neurogastroenterology & Motility*, 2015, 27(2): 160-174.
- [36] 胡志伟, 汪忠镐, 吴继敏, 等. 反流性食管炎严重程度与高分辨率测压的食管动力学关系[J]. *中华医学杂志*, 2017, (第 42 期): 3306-3311.
- [37] Kasamatsu S, Matsumura T, Ohta Y, et al. The Effect of Ineffective Esophageal Motility on Gastroesophageal Reflux Disease[J]. *Digestion*, 2017, 95(3): 221-228.
- [38] Chen C, Yi C, Liu T, et al. Altered sensorimotor responses to esophageal acidification in older adults with GERD[J]. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2010, 45(10): 1150-1155.
- [39] Eckley C A, Costa H O. Comparative study of salivary pH and volume in adults with chronic laryngopharyngitis by gastroesophageal reflux disease before and after treatment[J]. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2006, 72(1): 55-60.
- [40] Eckley C A, Rios L S, Rizzo L V. Salivary egf concentration in adults with reflux chronic laryngitis before and after treatment: preliminary results[J]. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2007, 73(2): 156-160.
- [41] 邹方明, 庄则豪. 胃食管反流病发病机制研究进展[J]. *中华临床医师杂志*

(电子版), 2011, 5(23): 7035-7037.

[42] 王瑞, 唐艳萍. 胃食管反流病病因病机研究进展[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2015, (2): 201-203.

[43] 谭佳成, 叶必星, 林琳. 胃食管反流病相关的细胞间隙增宽和紧密连接蛋白[J]. 胃肠病学, 2013, 18(10): 636-638.

[44] 陈文科, 周丽雅, 陆京京, 等. 食管远端鳞状上皮细胞间隙增宽对非糜烂性反流病诊断的价值[J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(13): 1142-1147.

[45] Farr é R, Fornari F, Blondeau K, et al. Acid and weakly acidic solutions impair mucosal integrity of distal exposed and proximal non-exposed human oesophagus[J]. Gut, 2010, 59(2): 164-169.

[46] Souza R F, Huo X, Mittal V, et al. Gastroesophageal Reflux Might Cause Esophagitis Through a Cytokine-Mediated Mechanism Rather Than Caustic Acid Injury[J]. Gastroenterology, 2009, 137(5): 1776-1784.

[47] Dunbar K B, Agoston A T, Odze R D, et al. Association of Acute Gastroesophageal Reflux Disease With Esophageal Histologic Changes[J]. JAMA, 2016, 315(19): 2104.

[48] Penagini R, Bravi I. The role of delayed gastric emptying and impaired oesophageal body motility[J]. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2010, 24(6): 831-845.

[49] Gourcerol G, Benanni Y, Boueyre E, et al. Influence of gastric emptying on gastro-esophageal reflux: a combined pH-impedance study[J]. Neurogastroenterology & Motility, 2013: n/a-n/a.

[50] Szczesniak M M, Fuentealba S E, Cook I J. Acid sensitization of esophageal mucosal afferents: implication for symptom perception in patients across the gastroesophageal reflux disease spectrum[J]. Clin J Pain, 2013, 29(1): 70-77.

[51] Kessing B F, Bredenoord A J, Saleh C M G, et al. Effects of Anxiety

and Depression in Patients With Gastroesophageal Reflux Disease[J]. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2015, 13(6): 1089-1095.

[52] Asling B, Jirholt J, Hammond P, et al. Collagen type III alpha I is a gastro-oesophageal reflux disease susceptibility gene and a male risk factor for hiatus hernia[J]. *Gut*, 2009, 58(8): 1063-1069.

[53] Patel A, Hasak S, Nix B D, et al. Genetic risk factors for perception of symptoms in GERD: an observational cohort study[J]. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2018, 47(2): 289-297.

[54] 姚佳, 原丽莉, 朱娜, 等. 反流性食管炎与小肠细菌过度生长的关系研究[J]. *中华消化杂志*, 2013, 33(12): 865-866.

[55] Revaiah P C, Kochhar R, Rana S V, et al. Risk of small intestinal bacterial overgrowth in patients receiving proton pump inhibitors versus proton pump inhibitors plus prokinetics[J]. *JGH Open*, 2018, 2(2): 47-53.

[56] Belei O, Olariu L, Dobrescu A, et al. Is It Useful to Administer Probiotics Together With Proton Pump Inhibitors in Children With Gastroesophageal Reflux?[J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2018, 24(1): 51-57.

[57] 金玲肖, 刘福, 龙惠珍, 等. 应用质子泵抑制剂导致小肠细菌过度生长发生的可能性[J]. *中国微生态学杂志*, 2010, 22(12): 1113-1114.

[58] 王洪艳. 埃索美拉唑联合枯草杆菌二联活菌治疗反流性食管炎的临床研究[D]. 青岛大学, 2017.

[59] 苏坤涵. 通降合剂治疗肝胃郁热型反流性食管炎的疗效评价及其对肠道菌群的影响[D]. 南京中医药大学, 2019.

[60] 程进伟, 余志金, 陈惠新. 调节肠道微生态对胃食管反流病与肠易激综合征重叠症患者临床症状及胃肠道功能的影响[J]. *广州医科大学学报*, 2018, 46(4): 28-31.

[61] 余英, 张杰, 高峰, 等. 反流性食管炎严重程度与食管黏膜菌群结构变化的关系初探[J]. *中国医药*, 2019, 14(10): 1519-1523.

- [62] Sugimoto M, Murata M, Mizuno H, et al. Endoscopic Reflux Esophagitis and Reflux-Related Symptoms after *Helicobacter pylori* Eradication Therapy: Meta-Analysis[J]. *J Clin Med*, 2020, 9(9).
- [63] Ashktorab H, Entezari O, Nouraie M, et al. *Helicobacter pylori* protection against reflux esophagitis[J]. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(11): 2924-2928.
- [64] 余英, 高峰, 张杰. 反流性食管炎治疗效果与食管下段菌群构成变化的关系研究[J]. *首都医科大学学报*, 2020, 41(02): 243-248.
- [65] Schiavi E, Gleinser M, Molloy E, et al. The Surface-Associated Exopolysaccharide of *Bifidobacterium longum* 35624 Plays an Essential Role in Dampening Host Proinflammatory Responses and Repressing Local TH17 Responses[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82(24): 7185-7196.
- [66] MacSharry J, O'Mahony C, Shalaby K H, et al. Immunomodulatory effects of feeding with *Bifidobacterium longum* on allergen-induced lung inflammation in the mouse[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2012, 25(4): 325-334.
- [67] Capurso L. Thirty Years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: A Review[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2019, 53 Suppl 1: S1-S41.
- [68] Mogna L, Deidda F, Nicola S, et al. In Vitro Inhibition of *Klebsiella pneumoniae* by *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *delbrueckii* LDD01 (DSM 22106): An Innovative Strategy to Possibly Counteract Such Infections in Humans?[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2016, 50 Suppl 2, Proceedings from the 8th Probiotics, Prebiotics & New Foods for Microbiota and Human Health meeting held in Rome, Italy on September 13-15, 2015: S136-S139.
- [69] Chiba N, De Gara C J, Wilkinson J M, et al. Speed of healing and symptom relief in grade II to IV gastroesophageal reflux disease: A meta-analysis[J]. *Gastroenterology* (New York, N.Y. 1943), 1997, 112(6): 1798-1810.
- [70] 侯太源, 黄小梅, 张冰冰, 等. 中西医结合药物治疗胃食管反流病的研究进

- 展[J]. 按摩与康复医学, 2020, 11(23): 10-13.
- [71] 杜连平, 马启明. 柴胡疏肝散合左金丸加减治疗反流性食管炎 65 例[J]. 光明中医, 2016, 31(21): 3081-3082.
- [72] 李影华, 苏冬梅, 白桦. 柴胡疏肝散加减治疗肝胃不和型反流性食管炎 98 例的临床观察[J]. 世界中医药, 2016, 11(08): 1437-1439.
- [73] 贾丽娟. 柴胡疏肝散合左金丸加味治疗胃食管反流病相关性胸痛的临床研究[D]. 湖北中医药大学, 2016.
- [74] 杜修桥, 张新贞. 大黄香砂六君子汤治疗胃食管反流病 43 例[J]. 河南中医, 2014, 34(11): 2222-2223.
- [75] 王凯文, 郭海龙, 孙恒青. 大黄香砂六君子汤治疗胃食管反流病疗效观察[J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(10): 68-69.
- [76] 陈世旺, 田旭东. 半夏厚朴汤治疗胃食管反流病的 Meta 分析[J]. 中国临床研究, 2014, 27(09): 1080-1082.
- [77] 付全芳, 许琦. 半夏厚朴汤加减治疗痰气交阻型胃食管反流病 43 例[J]. 内蒙古中医药, 2013, 32(12): 35-36.
- [78] 田英娟, 王维亭, 黄维芝. 半夏厚朴汤加减治疗胃食管反流病 32 例[J]. 内蒙古中医药, 2015, 34(04): 3-4.
- [79] 陈家坤, 韦汉鹃, 谢胜. 半夏泻心汤治疗胃食管反流病临床研究 Meta 分析[J]. 亚太传统医药, 2017, 13(03): 53-56.
- [80] 赵东梅, 赵艳红, 张涛. 反流性食管炎 PPAR γ , HIF-1 α 表达意义及半夏厚朴汤干预研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2015, 23(11): 783-786.
- [81] Khan F, Maradey-Romero C, Ganocy S, et al. Utilisation of surgical fundoplication for patients with gastro-oesophageal reflux disease in the USA has declined rapidly between 2009 and 2013[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2016, 43(11): 1124-1131.

附录二 量表

附表1 胃食管反流病问卷量表 (Gerd Q)			
请根据您过去7天内出现的症状, 认真填写下列问卷, 在□内打勾即可			
A1. 您过去7天内出现烧心症状的频率? ()			
0天	1天	2-3天	4-7天
☐ 0分	☐ 1分	☐ 2分	☐ 3分
A2. 您过去7天内出现胃内容物反流症状的频率? ()			
0天	1天	2-3天	4-7天
☐ 0分	☐ 1分	☐ 2分	☐ 3分
A 总积分=A1+A2 ()			
B1. 您过去7天内出现上腹部中央部位疼痛的频率? ()			
0天	1天	2-3天	4-7天
☐ 3分	☐ 2分	☐ 1分	☐ 0分
B2. 您过去7天内出现恶心症状的频率? ()			
0天	1天	2-3天	4-7天
☐ 3分	☐ 2分	☐ 1分	☐ 0分
B 总积分=B1+B2 ()			
C1. 您过去7天内由于烧心或反流而出现睡眠质量不佳的频率? ()			
0天	1天	2-3天	4-7天
☐ 0分	☐ 1分	☐ 2分	☐ 3分
C2. 您过去7天内服用除医嘱药物以外, 额外服用抗酸药等非处方药的频率? ()			
0天	1天	2-3天	4-7天
☐ 0分	☐ 1分	☐ 2分	☐ 3分
C 总积分=C1+C2 ()			
合计分数 ()			
*: 胃食管反流病问卷, 以 A+B+C 总积分 ≥ 8 者可提示 GERD 诊断, C 项评分 ≥ 3 分, 提示GERD影响生活质量。			

附表2 中医症状量化分级评分表

症状	评分标准	量化标准	治疗前得分	治疗后得分
烧心	无	正常 0分		
	偶有烧心, 持续时间短, 可自行缓解	轻度 2分		
	时有烧心, 持续时间较长, 偶需服药缓解	中度 4分		
	频频发作, 持续时间长, 需服药缓解	重度 6分		
反酸	无	正常 0分		
	偶有反酸, 可自行缓解	轻度 2分		
	时有反酸, 偶需服药缓解	中度 4分		
	频频反酸, 需服药缓解	重度 6分		
胸骨后疼痛	无	正常 0分		
	微痛, 时隐时现, 注意始得	轻度 1分		
	疼痛较重, 痛多持续, 不意易得	中度 2分		
	疼痛剧烈, 痛多持续, 或为阵作	重度 3分		
胃脘灼痛	无	正常 0分		
	轻微疼痛, 偶尔出现	轻度 1分		
	疼痛明显, 时发时止, 尚能忍受	中度 2分		
	疼痛剧烈, 难以忍受, 需服药缓解	重度 3分		
脘腹胀满	无	正常 0分		
	偶尔胀满, 时间短, 可自行缓解	轻度 1分		
	胀满明显, 时间较长, 偶需或不需服药	中度 2分		
	反复发作, 难以忍受, 需服药缓解	重度 3分		
暖气	无	正常 0分		
	每日3次以下	轻度 1分		
	每日4-9次	中度 2分		
	每日10次以上	重度 3分		
心烦易怒	无	正常 0分		
	偶尔发生	轻度 1分		
	时有发生, 但尚能自控	中度 2分		
	经常发生, 需服药控制	重度 3分		
嘈杂易饥	无	正常 0分		
	偶尔发生	轻度 1分		
	时有发生	中度 2分		
	经常发生	重度 3分		
口干口苦	无	正常 0分		
	晨起口干口苦	轻度 1分		
	时有口干口苦	中度 2分		
	经常口干口苦	重度 3分		
大便秘结	无	正常 0分		
	大便偏干, 每日1次	轻度 1分		
	大便干燥, 2-3日1次	中度 2分		
	大便干燥, 3日以上1次	重度 3分		
总分				

附表3 焦虑自评量表 (SAS)

评定项目	从无或偶尔	有时	经常	总是	得分
1. 我觉得比平常容易紧张或着急	1	2	3	4	
2. 我无缘无故地感到害怕	1	2	3	4	
3. 我容易心理烦乱或觉得惊恐	1	2	3	4	
4. 我觉得我可能将要发疯	1	2	3	4	
5. 我觉得一切都很好, 也不会发生什么不幸	4	3	2	1	
6. 我手脚发抖打颤	1	2	3	4	
7. 我因为头痛、颈痛和背痛而苦恼	1	2	3	4	
8. 我感觉容易衰弱和疲乏	1	2	3	4	
9. 我觉得心平气和, 并且容易安静坐着	4	3	2	1	
10. 我觉得心跳得很快	1	2	3	4	
11. 我因为一阵阵头晕而苦恼	1	2	3	4	
12. 我有晕倒发作, 或觉得要晕倒似的	1	2	3	4	
13. 我吸气呼气都感到很容易	4	3	2	1	
14. 我的手脚麻木和刺痛	1	2	3	4	
15. 我因为胃痛和消化不良而苦恼	1	2	3	4	
16. 我常常要小便	1	2	3	4	
17. 我的手脚常常是干燥温暖的	4	3	2	1	
18. 我脸红发热	1	2	3	4	
19. 我容易入睡并且一夜睡得很好	4	3	2	1	
20. 我做恶梦	1	2	3	4	
评分标准: 总分乘以1.25取整数, 即得标准分。低于50分者为正常, 50-60分者为轻度焦虑, 61-70分者为中度焦虑, 70分以上者为重度焦虑					

附录三 博士期间文章发表与科研

1 发表文献

[1]清郁和降汤对反流性食管炎模型大鼠 LPS/TLR4/NF- κ B 通路及食管黏膜屏障的影响，第一作者

[2] 基于 16S rRNA 测序研究清郁和降汤对反流性食管炎模型大鼠食管菌群的影响，第一作者

2 书籍著作

《叶松脾胃病诊治经验撷菁》，副主编；

《脾胃学说传薪集》，副主编；

荆楚医学流派名家系列（第一辑）之《荆楚医学名家叶松》，副主编；

致 谢

时光飞逝，三年的博士生活即将划上句号。犹记得三年前辞掉稳定工作的毅然决然，重返校园的踌躇满志。如今看来，我依然不后悔当初的决定。博士阶段的学习让我收获满满，感恩满满！

首先要衷心感谢我的导师叶松教授，我从2011年本科教改班开始，经历硕士，到博士，一直跟随叶老师学习，恩师在这十一年间对我关怀备至，无论是从学业上还是生活上，都给予了我无私的帮助，我的成长离不开您的谆谆教导和倾囊相授！离开校园就要独当一面了，不能继续在老师的护佑之下前行，我会一直谨记您的教导，始终保持谦逊认真的处事态度，刻苦扎实的学习态度和严谨细致的工作态度，做好自己份内的每一件事情。在此向恩师表示最真诚的感谢和最崇高的敬意！

衷心感谢脾胃病科周毅主任，对我在学习生活上的无私帮助和工作上的提携；衷心感谢脾胃病科黄鹤主任，全程指导我的博士课题，无论事情大小，尽全力帮我解决；谢谢师弟周易，全程参与我的博士课题，和我一起分摊各项工作任务；谢谢田淑敏、郭明雪、程定阳、周晗颖、段昱宇、蒋苏霖、韩静岚等师弟师妹，在实验过程中给予的帮助；谢谢刘云同学，毫无保留的同我分享各种课题经验；谢谢脾胃病科的每一位同事，我博士课题的顺利完成离不开大家的支持和帮助！

感谢同窗好友和亲人们在学习和生活中给予我的支持与帮助！

在此还要特别感谢我的爸爸、妈妈、弟弟和爱人陈金苍先生，正是有了你们的全力支持，我才能毫无后顾之忧的向前迈进，你们始终是我温暖的港湾和最坚实的后盾！

道阻且长，行则将至，行而不辍，未来可期！