

基于苦味受体和热敏受体探讨左金丸对胃食管反流病模型大鼠炎症因子的影响*

崔国良¹ 王曼莉² 孙志广^{1,2}

[摘要] 目的:基于苦味受体(TAS2R38)和热敏受体(TRPV1)探讨左金丸对胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease,GERD)模型大鼠炎症因子的影响。方法:将 40 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组及左金丸低、中、高剂量组,每组各 8 只。除假手术组大鼠外,其余各组采用手术造模方式构建 GERD 模型大鼠,造模成功 4 周后给予不同剂量左金丸干预治疗 4 周后,苏木精-伊红染色观察病理改变,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β ,IL-1 β)、IL-6 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α ,TNF- α)的含量,Western blot 法检测食管组织中 TAS2R38 和 TRPV1 表达水平。利用分子对接技术将左金丸中黄连和吴茱萸主要药效成分分别与 TAS2R38、TRPV1 进行分子对接模拟。为了进一步验证活性成分与靶点的关系,将 48 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、小檗碱组、小檗碱+U73122 组、吴茱萸碱组及吴茱萸碱+RTX 组,每组各 8 只。除假手术组大鼠外,其余各组大鼠进行模型制备,4 周后分别给予相应药物治疗,检测上述一致的指标。结果:与模型组大鼠比较,左金丸各剂量组大鼠食管组织病理明显改善,左金丸低、中、高剂量组大鼠血清中 IL-1 β 、TNF- α 含量显著降低,左金丸高剂量组大鼠血清中 IL-6 含量显著降低,左金丸中、高剂量组大鼠食管组织中 TAS2R38 的表达水平升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),但各组大鼠食管组织 TRPV1 表达无显著变化($P > 0.05$)。分子对接结果表明左金丸中黄连和吴茱萸分别作用于 TAS2R38、TRPV1 的有效成分可能是小檗碱和吴茱萸碱。验证实验进一步证实,与模型组比较,小檗碱组与吴茱萸碱组大鼠食管组织病理明显改善,血清中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量降低($P < 0.05$);与小檗碱组比较,小檗碱+U73122 组大鼠血清中 IL-6、TNF- α 的含量升高,食管组织中 TAS2R38 表达显著降低($P < 0.05$);与吴茱萸碱组比较,吴茱萸碱+RTX 组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 的含量升高,食管组织中 TRPV1 表达显著降低($P < 0.05$)。结论:左金丸能显著下调 GERD 大鼠炎症因子的含量,其作用机制可能是其有效成分小檗碱和吴茱萸碱分别靶向 TAS2R38、TRPV1 从而发挥作用。

[关键词] 胃食管反流病;左金丸;苦味受体;热敏受体;炎症因子

DOI:10.3969/j.issn.1671-038X.2023.12.10

[中图分类号] R573.02 **[文献标志码]** A

Exploring the effect of Zuojin Pill on inflammatory factors in gastroesophageal reflux disease model rats based on bitter taste receptors and transient receptor potential vanilloid 1

CUI Guoliang¹ WANG Manli² SUN Zhiguang^{1,2}

(¹Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210017, China; ²The First Clinical School of Nanjing University of Chinese Medicine)

Corresponding author: SUN Zhiguang, E-mail: zhiguangsun@njucm.edu.cn

Abstract Objective: To investigate the effect of Zuojin Pill on inflammatory factors in gastroesophageal reflux disease(GERD) model rats based on the bitter taste receptor TAS2R38 and transient receptor potential vanilloid 1(TRPV1). **Methods:** Forty SPF-grade male SD rats were randomly divided into sham surgery group, model group, and low, medium, and high dose groups of Zuojin Pill, with 8 rats in each group. Except for the sham group, surgical modeling was used to construct GERD model for all other groups. After 4 weeks of successful modeling, different doses of Zuojin Pills were administered for intervention treatment. After 4 weeks, hematoxylin-eosin staining was used to observe pathological changes, and enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

*基金项目:国家自然科学基金(No:82274399)

¹南京中医药大学第二附属医院脾胃科(南京,210017)

²南京中医药大学第一临床医学院

通信作者:孙志广,E-mail:zhiguangsun@njucm.edu.cn

was used to detect the content of interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum. Western blot method was used to detect the expression levels of TAS2R38 and TRPV1 in esophageal tissue. Based on molecular docking technology, the main pharmacological components of *Coptidis Rhizoma* and *Evodiae Fructus* in Zuojin Pill were simulated with TAS2R38 and TRPV1, respectively. In order to further verify the relationship between active components and targets, 48 SPF grade male SD rats were randomly divided into sham surgery group, model group, berberine group, berberine + U73122 group, evodiamine group, and evodiamine + RTX group, with 8 rats in each group. Except for the sham group rats, all other groups of rats were subjected to model preparation, and after 4 weeks, corresponding medication treatment was given and the consistent indicators mentioned above were detected. **Results:** Compared with the model group rats, the pathological changes of the esophageal tissue in each dose group of Zuojin Pill were significantly improved, and the content of IL-1 β , TNF- α in the low, medium, and high dose groups of Zuojin Pill rats were significantly down-regulated. The content of IL-6 in the serum of rats in the high-dose Zuojin Pill group was significantly decreased. The expression level of TAS2R38 in the esophageal tissue of rats in the middle and high-dose groups of Zuojin Pill were increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), but there was no significant change in the expression of TRPV1 in the esophageal tissue of rats in each group ($P > 0.05$). The molecular docking results indicate that the effective components of *Coptidis Rhizoma* and *Evodiae Fructus* in Zuojin Pill, which act on TAS2R38 and TRPV1 respectively, may be berberine and evodiamine. The validation experiment further confirmed that compared with the model group, the pathological changes in the esophageal tissue of rats in the berberine group and evodiamine groups were significantly improved, and the content of inflammatory factor including IL-1 β , IL-6, and TNF- α were decreased. Compared with the berberine group, the levels of IL-6 and TNF- α increased and the expression of TAS2R38 in esophageal tissue significantly decreased in the berberine + U73122 group. Compared with the evodiamine group, the content of IL-1 β and IL-6 increased and the expression of TRPV1 in esophageal tissue significantly decreased, in the evodiamine + RTX group, with statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion:** Zuojin Pill can significantly down-regulate the content of inflammatory factors in GERD rats, and its mechanism is that berberine and evodiamine are the effective components of Zuojin Pill respectively, exert anti-inflammatory effects by targeting TAS2R38 and TRPV1.

Key words gastroesophageal reflux disease; Zuojin Pill; bitter taste receptor; transient receptor potential vanilloid 1; inflammatory factors

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)是指胃或十二指肠内容物反流至食管,引起一系列不适的症状^[1]。GERD的病因和发病机制是复杂的,包括食管超敏反应、食管黏膜炎症以及酸暴露等^[2]。虽然质子泵抑制剂(PPI)能有效地减少酸反流,并被认为是治疗GERD的一线用药,但PPI只能减轻部分患者的胃食管反流症状,且长期服用后仍有复发的可能^[3]。

GERD属祖国医学“嘈杂”、“吐酸”等范畴。《素问·至真要大论》病机十九条中指出:“诸逆冲上,皆属于火”,“诸呕吐酸,暴注下迫,皆属于热”,故泻火降逆为本病主要治法。源自《丹溪心法》的左金丸是治疗本病的代表方之一,由黄连和吴茱萸两味药组成,共奏清肝泻火、降逆止呕之功。此外,多个GERD中医诊疗共识均推荐左金丸作为治疗GERD肝胃郁热证的代表方^[4-5]。

苦味受体(bitter taste receptors, TAS2Rs)是一类G蛋白耦联受体,在人体中广泛分布,其中消化道TAS2Rs的激活具有诱导腔内运动、调节食物摄入、减轻餐后胃内压力等作用^[6]。热敏受体,又称瞬时受体电位香草酸亚型1(transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1),与GERD的症状有密切关系,食管对反流物的敏感性受TRPV1表达以及其激活状态的影响^[7-8]。课题组前期研究及相

关文献均报道,左金丸中主要效应分子小檗碱和吴茱萸碱分别是TAS2R38和TRPV1的激动剂,并可引起一系列功能作用^[9-12]。但基于苦味受体与热敏受体探讨左金丸治疗GERD的机制研究笔者尚未见报道,中药复方多成分多靶点的复杂作用机制为本研究提供新思路,因此本研究采用正反方向实验思路探讨左金丸中有效成分是否分别通过靶向TAS2R38和TRPV1抑制GERD模型大鼠炎症,以期为左金丸治疗GERD的深入研究与临床应用提供一定理论与实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

7周龄健康SPF级雄性SD大鼠,体重(220±20)g,由江苏集萃药康生物科技公司提供,实验动物生产许可证号:SCXK(苏)2018-0008,饲养于南京中医药大学实验动物中心。

1.2 药物与试剂

左金丸(黄连、吴茱萸)中的药材由江苏省中医院中药房提供,将上述中药漂洗,浸泡,煎煮,过滤后合并,并浓缩成1g/mL浓度的中药药液,密封并保存于4℃冰箱备用。小檗碱、吴茱萸碱均购自上海源叶生物公司(货号:S27357、S31472);Rat IL-1 β 、IL-6、TNF- α ELISA检测试剂盒均购自杭州联科生物公司(货号:EK301B、EK306、EK382);

TAS2R38 抗体购自 Affinity 公司(货号:DF10267);TRPV1 抗体购自 Proteintech 公司(货号:66983-1-1g);GAPDH 抗体购自武汉赛维尔生物公司(货号:GB15004),鼠和兔二抗购自 Bioworld 公司(货号分别为:BS12478、BS13278);U73122 购自美国 selleck 公司(货号:S8011);树脂毒素(RTX)购自美国 CFW 实验室(货号:CFW-AN125100U);4%多聚甲醛固定液购自武汉赛维尔生物公司(货号:G1101),苏木精-伊红染色液购自北京雷根生物公司(货号:DH0006)。

1.3 仪器

组织包埋机(型号:EG1150,Leica);石蜡切片机(型号:RM2245,Leica);全自动定量病理成像系统(型号:Vectra 3.0,PerkinElmer);多功能酶标仪(型号:EnVision,PerkinElmer)。

1.4 造模、分组与给药

适应性喂养 1 周后,将 SPF 级 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、左金丸低剂量组、左金丸中剂量组和左金丸高剂量组,每组 8 只。根据《中国药典》2020 版,推荐左金丸最大剂量为 12 g,因此,根据人与动物间体表面积等效剂量公式可计算得出:左金丸低、中、高剂量组分别为给予 0.63、1.26、2.52 g/kg 左金丸灌胃治疗。根据参考文献[13-14],除了假手术组外,其余各组进行 GERD 模型构建:大鼠在异氟烷麻醉下,从剑突指向肛门方向,上腹部正中切开约 2 cm 的切口。打开腹腔后,剥离肝和胃之间的结缔组织,使食管下段暴露出来。将食管下段略微向左倾斜,暴露胃食管交界处的左侧。用一对锋利的剪刀在食管远端肌肉上切开 5 mm 的纵行切口来暴露食管上皮。并用锋利的手术剪切断大部分前胃。若胃内有内容物,则小心地去除胃内容物。利用 5-0 可吸收缝合线将切口中食管与胃纵向对应缝合,且这些缝线均匀地间隔 3~4 mm 进行缝合。用无菌生理盐水冲洗腹腔,清除血液和胃内容物。用 6-0 不可吸收缝合线缝合腹部皮肤。对照组大鼠给予假手术方式造模,即仅切开腹部并缝合。所有造模大鼠均给予抗生素治疗 3 d,并在造模后 4 周开始给予中药药物治疗。为了进一步确证 TAS2R38 和 TRPV1 是左金丸中黄连和吴茱萸有效成分的作用靶点,将 SPF 级 SD 大鼠适应性喂养 1 周后随机分为假手术组、模型组、小檗碱组、小檗碱+U73122 组、吴茱萸碱组、吴茱萸碱+RTX 组,每组 8 只。吴茱萸碱+RTX 组大鼠首先连续 3 d 分别给予 30、70、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 树脂毒素(resiniferatoxin, RTX)皮下注射,皮下注射 RTX 可导致全身 TRPV1 感受器消融^[15],2 周后进行 GERD 模型制备,造模后 4 周给予 40 mg/kg 吴茱萸碱药液灌胃^[16]。模型组、小檗碱组、小檗碱+U73122 组、吴茱萸碱组大鼠给

予 GERD 造模方法,造模 4 周后,小檗碱组给予 200 mg/kg 小檗碱灌胃治疗,吴茱萸碱组给予 40 mg/kg 吴茱萸碱灌胃治疗,小檗碱+U73122 组给予 200 mg/kg 小檗碱+20 mg/kg U73122 药液灌胃,连续 4 周。

1.5 标本采集与实验处理

给药 4 周后,禁食不禁水 24 h,异氟烷麻醉,腹主动脉采血,于 4℃ 离心机中 3 000 r/min 离心 15 min,吸取上层血清用于后续酶联吸附试验(ELISA)检测,根据说明书在 96 孔酶标板中操作,经显色后在酶标仪中设置波长为 450 nm 和 570 nm 波长后检测。取食管下段于 4%多聚甲醛中固定,随后进行梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切片后苏木精-伊红染色,中性树脂封固,光学显微镜下观察。提取各组大鼠食管组织总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,进行凝胶电泳及转膜,脱脂奶粉封闭 2 h 后 4℃ 孵育一抗过夜,次日 TBST 洗膜后,室温下孵育二抗 2 h, TBST 洗膜后采用凝胶成像系统显影,以 GAPDH 作为内参,计算目的蛋白与内参蛋白的灰度值,其比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.6 分子对接

TAS2R38 和 TRPV1 的 3D 结构分别从苦味受体及配体网站 BitterDB(<http://bitterdb.agri.huji.ac.il/dbbitter.php>)和 RCSB PDB 数据库(<http://www.RCSB.org/>)获得;使用 Discovery Studio 软件去除晶体结构中的水分子和小分子,然后使用 Autodock tools 软件添加氢,再保存为 pdbqt 格式文件。利用 Autodock 工具软件将黄连和吴茱萸中重要活性化合物(小檗碱、表小檗碱、吴茱萸碱、吴茱萸次碱)作为配体与蛋白受体连接。使用 Pymol 和 maestro 软件绘制了结合能小于 -7 的分子对接结构。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行数据分析,符合正态分布计量资料以 $\bar{X} \pm S$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 左金丸对 GERD 大鼠食管病理形态的影响

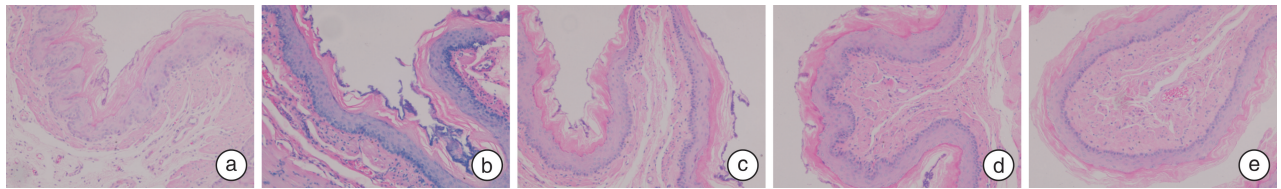
苏木精-伊红染色结果显示:假手术组大鼠食管下段黏膜完整,未见乳头状增生以及基层层明显增厚,炎性细胞浸润较少;模型组大鼠食管乳头状增生较为明显,基层层稍增厚,基层层下可见大量炎性细胞浸润;左金丸低、中、高剂量组食管下段炎性细胞浸润较模型组明显改善,乳头状增生较少,其中以高剂量效果尤为明显。见图 1。

2.2 左金丸对 GERD 大鼠血清中炎症因子的影响

与假手术组比较,模型组大鼠炎症明显加重,

即血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 左金丸低、中、高剂量组大鼠血清中 IL-1 β 、TNF- α 含量明显降低 ($P < 0.01$), 左金丸高剂量组大鼠血清中 IL-6 含量明显降低 ($P <$

0.05), 左金丸低、中剂量组 IL-6 含量亦有降低趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。结果表明, GERD 手术造模方式可导致大鼠炎症因子水平显著上调, 而左金丸对其具有显著抑制作用。



a: 假手术组; b: 模型组; c: 左金丸低剂量组; d: 左金丸中剂量组; e: 左金丸高剂量组。

图 1 各组大鼠食管下段组织病理学改变 (×200)

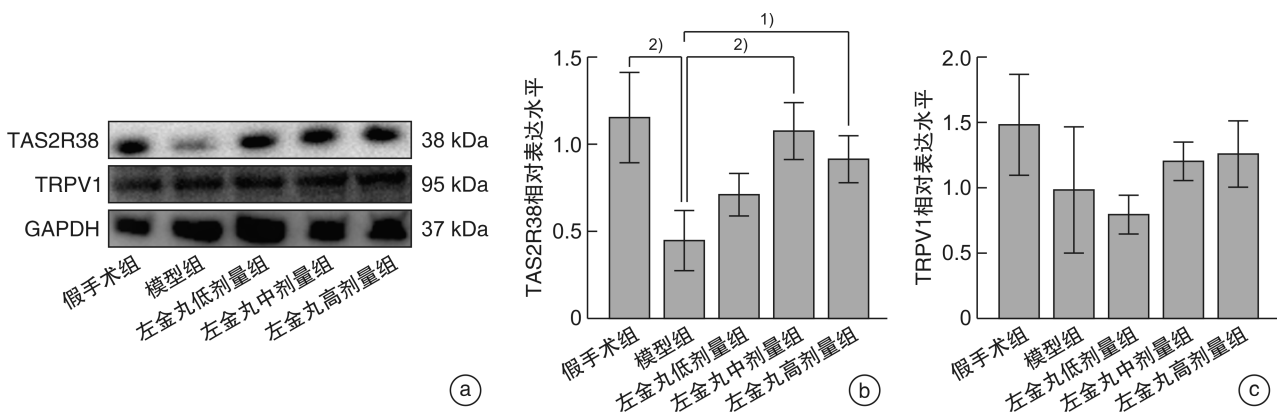
组别	例数	IL-1 β	IL-6	TNF- α
假手术组	3	54.86 ± 5.97 ²⁾	88.99 ± 28.83 ²⁾	66.85 ± 13.63 ²⁾
模型组	3	172.94 ± 26.11	255.30 ± 25.38	281.83 ± 47.23
左金丸低剂量组	3	93.58 ± 10.33 ²⁾	199.50 ± 68.32	176.16 ± 18.58 ²⁾
左金丸中剂量组	3	90.67 ± 15.55 ²⁾	161.51 ± 36.46	154.30 ± 13.63 ²⁾
左金丸高剂量组	3	82.93 ± 29.64 ²⁾	138.18 ± 14.91 ¹⁾	135.15 ± 17.30 ²⁾

与模型组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

2.3 左金丸对 GERD 大鼠食管组织中 TAS2R38 和 TRPV1 蛋白表达的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠食管组织中 TAS2R38 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 左金丸中、高剂量组 TAS2R38 蛋白表达水平明显上调 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组比

较, 假手术组及左金丸低、中、高剂量组大鼠食管组织中 TRPV1 蛋白表达水平无明显变化 ($P > 0.05$), 考虑左金丸中的有效成分是通过激活 TRPV1 发挥治疗作用, 而不是通过调控其蛋白表达水平。见图 2。



a: Western blot 图; b: 各组 TAS2R38 蛋白相对表达水平; c: 各组 TRPV1 蛋白相对表达水平。与模型组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

图 2 各组大鼠食管组织中 TAS2R38 和 TRPV1 蛋白表达

2.4 左金丸有效成分与靶点的分子对接结果

为了筛选左金丸中关键起效成分, 我们利用分子对接技术将左金丸中黄连和吴茱萸中的重要活性化合物分别与 TAS2R38 和 TRPV1 进行对接。结果显示: 吴茱萸中吴茱萸碱、吴茱萸次碱与 TR-

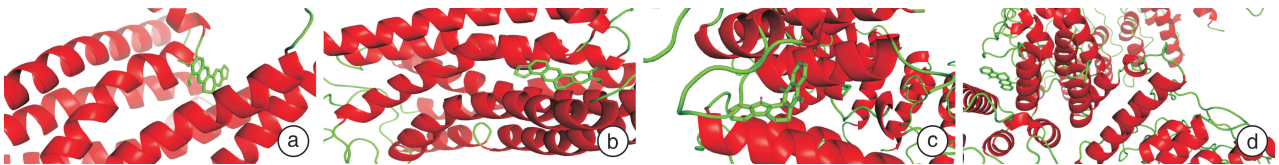
PV1 均有较好的结合活性, 且吴茱萸碱的结合能更低, 即吴茱萸碱与 TRPV1 之间发生相互作用的可能性更大, 表明其可能是吴茱萸起效的潜在重要化合物。此外, 黄连中小檗碱、表小檗碱同样表现出与 TAS2R38 较好的结合活性, 且小檗碱结合能更

低,表明小檗碱可能是黄连中的潜在药效分子。见图 3、表 2。

2.5 小檗碱和吴茱萸碱对 GERD 大鼠食管病理形态的影响

为了进一步证实分子对接筛选的结果,本研究给予黄连中关键成分小檗碱干预治疗的同时给予苦味受体的抑制剂 U73122;此外,本研究还利用 RTX 实现大鼠全身 TRPV1 受体的消融,观察 TRPV1 受体的沉默是否影响吴茱萸碱的治疗作用。苏木精-伊红染色结果显示:小檗碱干预治疗

后,GERD 模型大鼠食管下段组织病理学模型改善,炎性细胞浸润明显减少,而苦味受体抑制剂能抑制小檗碱的改善作用,小檗碱+U73122 组大鼠炎性细胞浸润较为明显。同样,吴茱萸碱能改善 GERD 模型大鼠食管下段病理学改变,但 RTX 处理后减弱吴茱萸碱的疗效。以上结果初步证实小檗碱和吴茱萸碱分别是左金丸中黄连和吴茱萸治疗 GERD 中的关键起效分子,且其作用机制是分别靶向 TAS2R38 和 TRPV1。见图 4。



a:小檗碱与 TAS2R38;b:表小檗碱与 TAS2R38;c:吴茱萸碱与 TRPV1;d:吴茱萸次碱与 TRPV1。

图 3 分子对接结果图

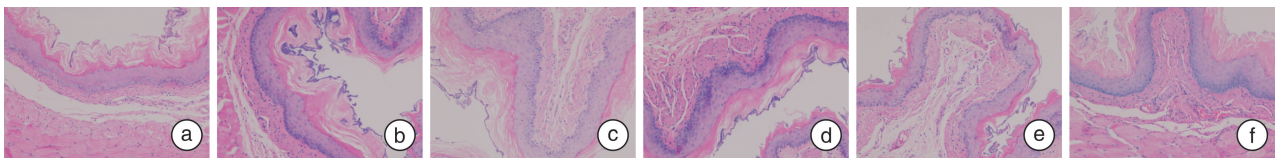
表 2 左金丸中关键活性成分与 TAS2R38 和 TRPV1 分子对接结果

化合物	TRPV1-结合能	化合物	TAS2R38-结合能
吴茱萸碱	-10.0	小檗碱	-8.0
吴茱萸次碱	-9.4	表小檗碱	-7.8

2.6 小檗碱和吴茱萸碱对 GERD 大鼠血清炎症因子的影响

为了进一步确证 TAS2R38 和 TRPV1 是左金丸中黄连和吴茱萸有效成分的作用靶点,我们给予小檗碱灌胃治疗的同时给予苦味受体抑制剂 U73122,利用皮下注射 RTX 的化学沉默方法观察

TRPV1 的消融是否能减弱吴茱萸碱的治疗作用。结果表明,与模型组比较,小檗碱组和吴茱萸碱组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量显著降低 ($P < 0.01$);与小檗碱组比较,小檗碱+U73122 组大鼠血清中 IL-6、TNF- α 含量明显升高 ($P < 0.01$),而 IL-1 β 含量有升高的趋势,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$);与吴茱萸碱组比较,吴茱萸碱+RTX 组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 含量明显升高 ($P < 0.05$),TNF- α 含量有升高的趋势,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。上述结果表明 TAS2R38 和 TRPV1 分别是左金丸中黄连和吴茱萸有效成分发挥抑制炎症的作用靶点。见表 3。



a:假手术组;b:模型组;c:小檗碱组;d:小檗碱+U73122 组;e:吴茱萸碱组;f:吴茱萸碱+RTX 组。

图 4 各组大鼠食管下段组织病理学改变($\times 200$)

表 3 小檗碱和吴茱萸碱对 GERD 大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量的影响

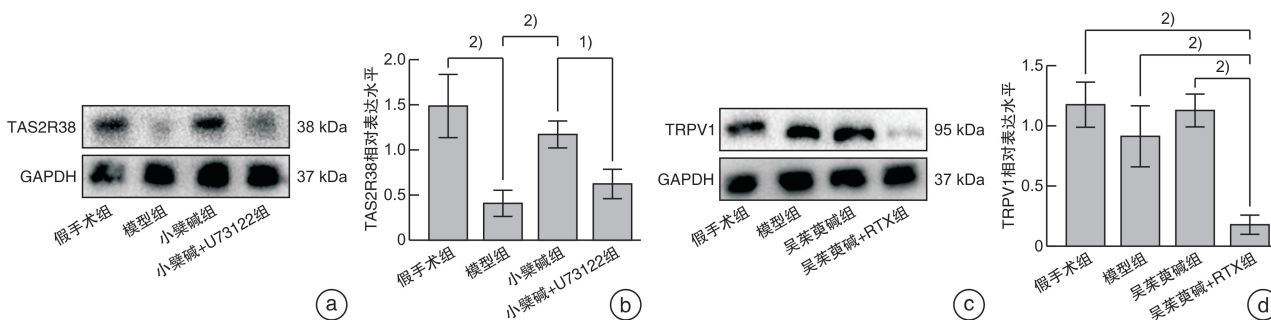
组别	例数	IL-1 β	IL-6	TNF- α
假手术组	3	69.38 \pm 13.06 ¹⁾	95.65 \pm 15.34 ¹⁾	80.35 \pm 17.10 ¹⁾
模型组	3	179.50 \pm 22.76	247.43 \pm 36.23	289.12 \pm 35.62
小檗碱组	3	88.20 \pm 20.48 ¹⁾	139.31 \pm 12.56 ¹⁾	126.70 \pm 11.91 ¹⁾
小檗碱+U73122 组	3	154.55 \pm 13.65	205.85 \pm 16.01 ²⁾	223.99 \pm 26.55 ²⁾
吴茱萸碱组	3	91.10 \pm 11.37 ¹⁾	127.92 \pm 18.74 ¹⁾	139.73 \pm 8.93 ¹⁾
吴茱萸碱+RTX 组	3	147.88 \pm 12.78 ³⁾	204.84 \pm 16.50 ³⁾	207.43 \pm 15.81

与模型组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与小檗碱组比较,²⁾ $P < 0.01$;与吴茱萸碱组比较,³⁾ $P < 0.05$ 。

2.7 小檗碱和吴茱萸碱对 GERD 大鼠食管组织中 TAS2R38 和 TRPV1 蛋白表达的影响

为了进一步确证左金丸的有效成分小檗碱和吴茱萸碱分别对 TAS2R38 和 TRPV1 蛋白表达的影响,我们利用 Western blot 技术检测发现:与假手术组比较,模型组大鼠食管中的 TAS2R38 蛋白表达水平显著下调,GERD 大鼠给予小檗碱干预治疗

后,TAS2R38 蛋白表达水平升高,给予苦味受体抑制剂 U73122 后能抑制小檗碱对 TAS2R38 的上调作用。同样,与模型组比较,假手术组和吴茱萸碱组中 TRPV1 表达水平无显著变化;给予 RTX 后,食管组织中 TRPV1 蛋白表达水平较其余组大鼠显著降低,吴茱萸碱对 TRPV1 表达水平无显著影响。见图 5。



a,b: TAS2R38 蛋白相对表达水平;c,d:TRPV1 蛋白相对表达水平。¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

图 5 各组大鼠食管组织中 TAS2R38 和 TRPV1 蛋白的表达

3 讨论

高复发率是 GERD 治疗的难点。多项研究表明,26.0%~47.8% 的 GERD 患者接受 4~8 周 PPI 治疗后出现复发,延长随访到 1 年后复发率为 30.4%^[17-18]。因此,寻找疗效稳定、安全性高、能有效改善 GERD 患者的临床症状及炎症反应等特点的药物对 GERD 治疗和防止复发具有重要意义。在中医的“整体观念”以及“辨证论治”的指导下,左金丸作为寒热并用的代表方之一,临床上的应用能很好解决这一难点^[19]。

GERD 的病理生理学主要涉及炎症以及免疫反应等^[20]。有临床研究表明,与健康对照患者比较,GERD 患者 IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 和 TNF- α 的表达水平升高^[21]。左金丸是寒热并用泻火降逆治疗吐酸肝火犯胃证的代表方剂,有研究表明,该方能显著下调 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠模型血清 TNF- α 和 IL-6 水平^[22]。苦味理论和苦味药物在中医临床中应用广泛,中医理论认为苦能燥、能泄、能坚,因此苦味中药中泻下、泻火、泄气、降气的作用在治疗消化道疾病中扮演着重要角色。同样,中医基础理论认为辛味“能散能行”,即具有发散、行气、行血的作用,同样在消化系统疾病的治疗发挥重要作用。本课题组前期研究以及文献报道发现,胃肠道表达的苦味受体发挥着重要的病理生理作用,且能够被左金丸中的苦味物质激活;与 GERD 中食管敏感密切相关的 TRPV1 则能够被左金丸中辛味物质激活。既往的报道显示 TAS2R38 和 TRPV1 的激活对炎症有抑制作用,例如,TAS2R16 的激活可以抑制脂多糖诱导的牙龈成纤维

细胞促炎细胞因子的释放^[23],TAS2R3、4、5、9、10、14、30、39 和 40 的激活能抑制 LPS 诱导的 TNF- α 、CCL3 和 CXCL8 的释放^[24]。TRPV1 的激活可以下调高脂饮食小鼠的炎症反应,并能减少炎症信号向大脑的传递^[25-26]。

在本研究中,左金丸显著下调了 GERD 模型大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平,改善了 GERD 大鼠食管黏膜病理。使用虚拟对接技术筛选出其主要效应成分小檗碱和吴茱萸碱后,发现上述成分是左金丸发挥抗炎作用治疗 GERD 的主要物质基础。RTX 是一种强效的 TRPV1 通道激动剂,皮下注射可导致全身 TRPV1 感受器消融,我们在使用了 TAS2R38 下游信号分子 PLC β 2 抑制剂 U73122 和促使 TRPV1 消融的 RTX 分别阻断苦味受体和热敏受体的信号传导后,GERD 模型大鼠的血清炎症因子显著上调。这些结果表明,左金丸通过其主要药效成分小檗碱和吴茱萸碱发挥抗炎作用治疗 GERD,其作用机制可能是通过靶向 TAS2R38 和 TRPV1 实现。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Mehta RS, Staller K, Chan AT. Review of Gastroesophageal Reflux Disease[J]. JAMA, 2021, 325(14): 1472.
- [2] Jung HK, Tae CH, Song KH, et al. 2020 Seoul Consensus on the Diagnosis and Management of Gastroesophageal Reflux Disease [J]. J Neurogastroenterol Motil, 2021, 27(4): 453-481.
- [3] Gyawali CP, Kahrilas PJ, Savarino E, et al. Modern diagnosis of GERD: the Lyon Consensus[J]. Gut, 2018,

- 67(7):1351-1362.
- [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(5):321-326.
- [5] 张北华,周秉舵,唐旭东.胃食管反流病中医诊疗专家共识(2023)[J].中医杂志,2023,64(18):1935-1944.
- [6] 王曼莉,孙志广.胃肠苦味受体与胃肠动力相关性的研究进展[J].陕西中医药大学学报,2022,45(2):132-136.
- [7] Patcharatrakul T, Kriengkirakul C, Chaiwatanarat T, et al. Acute Effects of Red Chili, a Natural Capsaicin Receptor Agonist, on Gastric Accommodation and Upper Gastrointestinal Symptoms in Healthy Volunteers and Gastroesophageal Reflux Disease Patients [J]. *Nutrients*, 2020, 12(12):3740.
- [8] Cheng Y, Kou F, Zhang X, et al. Network Pharmacology Analysis of Hewei Jiangni Granule for Gastroesophageal Reflux Disease and Experimental Verification of Its Anti-Neurogenic Inflammation Mechanism [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16:1349-1363.
- [9] 顾任钧.基于 5-HT₄R/TAS₂R38 探讨半夏泻心汤辛开苦降法治疗功能性消化不良的机制[D].南京:南京中医药大学,2023.
- [10] 陈曷仔.基于 TAS₂R38 探究小檗碱治疗溃疡性结肠炎的分子机制[D].南京:南京中医药大学,2022.
- [11] Zhang WD, Chen XY, Wu C, et al. Evodiamine reduced peripheral hypersensitivity on the mouse with nerve injury or inflammation[J]. *Mol Pain*, 2020, 16:1744806920902563.
- [12] Sun S, Yang Y, Xiong R, et al. Oral berberine ameliorates high-fat diet-induced obesity by activating TAS₂R_s in tuft and endocrine cells in the gut[J]. *Life Sci*, 2022, 311(Pt A):121141.
- [13] Zhao Y, Ma T, Zhang Z, et al. Resolvin D1 attenuates acid-induced DNA damage in esophageal epithelial cells and rat models of acid reflux[J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 912:174571.
- [14] He J, Fang Y, Chen X. Surgical Models of Gastroesophageal Reflux with Mice [J]. *J Vis Exp*, 2015, (102):e53012.
- [15] Mishra SK, Hoon MA. Ablation of TrpV1 neurons reveals their selective role in thermal pain sensation[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2010, 43(1):157-163.
- [16] Zhang W, Lyu M, Bessman NJ, et al. Gut-innervating nociceptors regulate the intestinal microbiota to promote tissue protection[J]. *Cell*, 2022, 185(22):4170-4189. e20.
- [17] Jung DH, Youn YH, Jung HK, et al. On-demand Versus Continuous Maintenance Treatment With a Proton Pump Inhibitor for Mild Gastroesophageal Reflux Disease: A Prospective Randomized Multicenter Study [J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2023, 29(4):460-469.
- [18] Lei WY, Chang WC, Wen SH, et al. Predicting factors of recurrence in patients with gastroesophageal reflux disease: a prospective follow-up analysis [J]. *Therap Adv Gastroenterol*, 2019, 12:1756284819864549.
- [19] 徐婷婷.加味左金丸治疗肝胃郁热型难治性胃食管反流病的临床疗效观察[D].南京:南京中医药大学,2017.
- [20] Winkelsett L, Malfertheiner P, Wex T, et al. Mucosal Two-Step Pathogenesis in Gastroesophageal Reflux Disease: Repeated Weakly Acidic Stimulation and Activation of Protease-Activated Receptor-2 on Mucosal Interleukin-8 Secretion [J]. *Digestion*, 2018, 98(1):19-25.
- [21] Zavala-Solares MR, Fonseca-Camarillo G, Valdovinos M, et al. Gene expression profiling of inflammatory cytokines in esophageal biopsies of different phenotypes of gastroesophageal reflux disease: a cross-sectional study [J]. *BMC Gastroenterol*, 2021, 21(1):201.
- [22] 张照,杨菊,王加伟,等.左金丸对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎的作用及其机制[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(16):1-11.
- [23] Zhou Z, Xi R, Liu J, et al. TAS₂R₁₆ Activation Suppresses LPS-Induced Cytokine Expression in Human Gingival Fibroblasts [J]. *Front Immunol*, 2021, 12:726546.
- [24] Grassin-Delyle S, Salvator H, Mantov N, et al. Bitter Taste Receptors (TAS₂R_s) in Human Lung Macrophages: Receptor Expression and Inhibitory Effects of TAS₂R Agonists [J]. *Front Physiol*, 2019, 10:1267.
- [25] Zhang Y, Lin G, Xue N, et al. Differential outcomes of high-fat diet on age-related rescaling of cochlear frequency place coding [J]. *FASEB J*, 2023, 37(10):e23167.
- [26] Abdel-Salam O, Mózsik G. Capsaicin, The Vanilloid Receptor TRPV1 Agonist in Neuroprotection: Mechanisms Involved and Significance [J]. *Neurochem Res*, 2023, 48(11):3296-3315.

(收稿日期:2023-09-22)