

活血通降方对反流性食管炎大鼠食管内脏高敏感及 LPS/TLR4/MC 通路的影响*

李培彩¹ 唐艳萍¹ 尹红² 杨磊¹ 刘琰¹ 刘思雨¹

[摘要] 目的:研究活血通降方对反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)模型大鼠脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)/Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)/肥大细胞(mast cell, MC)通路的影响,探讨其对食管内脏高敏感的疗效机制。**方法:**将50只Wistar大鼠随机分为对照组、模型组、西药组、中药高剂量组及中药低剂量组5个组,每组10只。对照组行腹腔开关术,其余各组均采用改良部分贲门肌切开术+外置幽门部分结扎术联合束缚应激建立RE大鼠模型。造模7d后,各组分别给予相应剂量药物或相同体积生理盐水灌胃,连续给药14d,2次/d。苏木精-伊红染色评价食管黏膜病理表现及评分;采用行为学评分和观察肌电图变化评价大鼠食管的内脏敏感性;采用甲苯胺蓝染色检测食管组织中MC数目;采用免疫组织化学法检测食管组织类胰蛋白酶(tryptase, TPS)和结肠组织中紧密连接蛋白ZO-1及Occludin的表达。采用酶联免疫吸附法检测血清LPS、IL-8含量,采用蛋白免疫印迹法检测食管组织中TLR4的表达。**结果:**与对照组比较,模型组大鼠滴酸刺激时的行为学评分及颈斜方肌肌电图曲线下面积(area under curve, AUC)比值均明显增高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,西药、低剂量及高剂量中药干预后,各组大鼠行为学评分及肌电图AUC比值均降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。其中,与西药组比较,中药各组肌电图AUC比值降低更为显著,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组比较,模型组血清LPS、IL-8的含量、食管黏膜病理评分和TLR4表达水平、食管组织中MC数目及TPS表达水平均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);结肠组织中Occludin与ZO-1的表达均显著下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。给予药物干预后,中药低剂量组及高剂量组大鼠血清LPS、IL-8含量、食管黏膜病理评分和TLR4表达、食管组织中MC数目及TPS的表达水平均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);结肠组织中Occludin与ZO-1的表达均上调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。中药高剂量组对上述指标的作用均优于西药组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**活血通降方可改善RE大鼠食管黏膜炎症和内脏高敏感,机制可能与保护肠黏膜屏障功能,降低LPS水平,抑制LPS/TLR4/MC通路,减少MC脱颗粒和TPS的释放有关。

[关键词] 反流性食管炎;活血通降方;内脏高敏感;脂多糖;肥大细胞;Toll样受体4

DOI:10.3969/j.issn.1671-038X.2023.07.11

[中图分类号] R473.5 [文献标志码] A

Effect of Huoxue Tongjiang Decoction on esophageal visceral hypersensitivity and lipopolysaccharide/Toll-like receptor 4/mast cell pathway in rats with reflux esophagitis

LI Peicai¹ TANG Yanping¹ YIN Hong² YANG Lei¹ LIU Yan¹ LIU Siyu¹

(¹Department of Gastroenterology II, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin, 300100, China; ²Graduate School of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine)

Corresponding author: TANG Yanping, E-mail: cb1699@sina.com

Abstract Objective: To study the effect of Huoxue Tongjiang Decoction on lipopolysaccharide(LPS)/Toll-like receptor 4(TLR4)/mast cell(MC) pathway in reflux esophagitis(RE) model rats, and to explore the therapeutic mechanism of Huoxue Tongjiang Decoction on esophageal visceral hypersensitivity. **Methods:** A total of 50 Wistar rats were randomly divided into control group, model group, Western Medicine group, high dose Chinese Medicine group and low dose Chinese Medicine group, with 10 rats in each group. The control group underwent an abdominal switch surgery, and the other four groups were treated with modified partial cardiac myotomy + external pylorus partial ligation and restraint stress to establish the RE model rats. After seven days of modeling, each group was given corresponding doses of drugs or the same volume of physiological saline by gavage for 14

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(No:82074213, No:82274253, No:82204988);天津市中医药管理局资助项目(No:2021045)

¹天津市南开医院消化内科二(天津,300100)

²天津中医药大学研究生院

通信作者:唐艳萍, E-mail: cb1699@sina.com

引用本文:李培彩,唐艳萍,尹红,等.活血通降方对反流性食管炎大鼠食管内脏高敏感及LPS/TLR4/MC通路的影响[J].中国中西医结合消化杂志,2023,31(7):538-544,551. DOI:10.3969/j.issn.1671-038X.2023.07.11.

consecutive days, twice a day. HE staining was used to evaluate the pathological manifestations and scoring of esophageal mucosae. Evaluation of visceral sensitivity of rat esophagus using behavioral scoring and observation of electromyographic changes. Toluidine blue staining was used to detect the number of MC in esophageal tissues. The expression of TPS in esophageal tissues and the tight junction proteins ZO-1 and Occludin in colon tissues were detected by immunohistochemistry. The serum levels of LPS and IL-8 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The expression of TLR4 in esophageal tissues was detected by Western blot. **Results:** Compared with the control group, the behavioral scores and area under curve(AUC) ratio of cervical trapezius muscle electromyography in the model group were significantly increased($P < 0.01$). Compared with the model group, after the intervention of western medicine, low dose and high dose of Traditional Chinese Medicine, the behavioral scores and AUC ratio of EMG of rats in each group were decreased($P < 0.01$). Among them, compared with the Western Medicine group, the AUC ratio of EMG in the Chinese Medicine group decreased more significantly($P < 0.05$). Compared with the control group, the serum levels of LPS and IL-8, the pathological score and expression of TLR4 in esophageal mucosa, the number of MC and the expression of TPS in esophageal mucosa in the model group were significantly increased($P < 0.05$). The expressions of Occludin and ZO-1 in colonic mucosa were significantly decreased($P < 0.01$). After drug intervention, the serum LPS and IL-8 content, TLR4 expression in esophageal mucosa, the number of MC and TPS expression in esophageal mucosa of the low dose and high dose of Chinese Medicine group were significantly decreased($P < 0.01$); the expressions of ZO-1 and Occludin in colonic mucosa were up-regulated($P < 0.05$). The effects of high dose of Traditional Chinese Medicine on the above indicators were better than those of Western Medicine group($P < 0.05$). **Conclusion:** Huoxue Tongjiang Decoction can improve esophageal mucosal inflammation and visceral hypersensitivity in RE rats, which may be related to protecting the intestinal mucosal barrier function, reducing LPS levels, inhibiting the LPS/TLR4/MC pathway, reducing MC degranulation and TPS release.

Key words reflux esophagitis; Huoxue Tongjiang Decoction; visceral hypersensitive; lipopolysaccharide; mast cell; Toll-like receptor 4

反流性食管炎(reflex esophagitis, RE)是指胃及十二指肠内容物反流入食管,引起食管黏膜炎症、糜烂等病变的一种消化系统疾病^[1]。RE是胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)的常见临床类型之一。我国的RE患病率约为6.4%^[2]。随着饮食结构的改变、生活节奏的加快,RE的患病率也在逐年升高。目前西医主要以抑酸治疗为主,但疗效并不十分满意。我们前期研究发现,使用8周标准质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI)治疗后,有11%的RE患者仍存在GERD症状^[3]。这些难治性RE患者病程迁延反复,不仅影响生活质量,而且反复就诊,消耗大量医疗资源。RE的发病机制尚不完全明确,多项专家共识意见均提出:食管免疫炎症及内脏高敏感是RE难治的重要原因^[1,4]。最新研究显示,RE患者存在肠道菌群紊乱,并与RE的发生进展及内脏高敏感密切相关^[5],但具体机制尚不清楚。我们前期研究表明,RE大鼠肠道菌群发生紊乱,革兰阴性菌增多^[6]。最新研究表明,随着肠道内革兰阴性菌数量增多,其代谢产物脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)随之增多,其从肠腔进入体循环后,可与Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)结合参与相关疾病的发生、发展^[7]。肥大细胞(mast cell, MC)表面存在TLR4, LPS可通过与MC表面的TLR4结合活化MC,促使MC脱颗粒释放类胰蛋白酶(trypsin, TPS)以及多种炎性递质,如IL-8等,介

导机体免疫炎症反应,改变食管黏膜通透性并使神经兴奋性增高引起感觉过敏^[8-9]。

本课题组前期研究发现,活血通降方除具有抑酸、抑制黏膜免疫炎症、迅速修复黏膜损伤及改善食管下括约肌张力等作用外,对调节肠道菌群紊乱及改善食管内脏高敏感相关症状也具有优势,但其治疗机制尚不明确^[6,10-12]。本研究通过建立内脏高敏感RE大鼠模型,研究活血通降方对大鼠肠道黏膜屏障及LPS/TLR4/MC通路的影响,探讨其改善食管内脏高敏感的可能疗效机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象

SPF级8周龄雄性Wistar大鼠50只,体重250~280 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[实验动物许可证号:SCXK(京)2021-0011]。实验开始前适应性喂养7 d。动物实验方案已经天津市南开医院伦理委员会批准(No:IRM-DWLL-2021135)。

1.2 药物与试剂

活血通降方由白及30 g、丹参30 g、枳壳15 g、香附15 g、郁金10 g、半夏10 g、旋覆花30 g组成,所有饮片均购自天津市南开医院中药房,由天津市南开医院药物实验室以水提醇沉法分别提取单药有效成分,加工浓缩制成糊剂,确定生药含量为1.47 g/mL。西药混悬液:制备含奥美拉唑、吗丁啉及铝碳酸镁的混悬液。均于4℃冰箱冷藏保存。

试剂:异氟烷(20211101,瑞普生物药业有限公司);大鼠 LPS ELISA 试剂盒(MM-0647R2, ME-IMIAN);大鼠 IL-8 ELISA 试剂盒(MM-0175R2, MEIMIAN);TPS 抗体(13343-1-AP, Proteintech);甲苯胺蓝染液(G3668,北京索莱宝科技有限公司);TLR4 抗体(sc-293072, Santa cruz biotechnology);ZO-1 抗体(21773-1-AP, Proteintech);Occludin 抗体(13409-1-AP, Proteintech);GAPDH 抗体(10494-1-AP, Proteintech)。

1.3 主要仪器

光学显微镜(德国 Leika);生物信号采集处理系统(中国北京智鼠多宝生物科技有限责任公司);化学发光成像仪(美国 Bio-Rad);多功能酶标仪(美国 Thermo)。

1.4 方法

1.4.1 动物分组及干预方法 50 只大鼠随机分为对照组、模型组、中药低剂量组、高剂量组及西药组,每组 10 只。异氟烷吸入麻醉下,对照组行腹腔开关术,其余各组采用改良部分贲门肌切开术+外置幽门部分结扎术^[13]制备 RE 大鼠模型。造模 7 d 后,连续给予束缚应激^[14] 14 d,同时中药低剂量组及高剂量组分别给予相应剂量活血通降方灌胃,西药组给予西药混悬液灌胃,对照组及模型组给予等体积的生理盐水灌胃,2 次/d,连续干预 14 d。按动物体表面积比率换算等剂量法计算,中药低剂量组、高剂量组给药剂量分别为生药含量 14.7、29.4 g/(kg/d);西药组给药剂量为奥美拉唑 4.2 mg/(kg/d)、吗丁啉 3.15 mg/(kg/d)、铝碳酸镁 0.16 g/(kg/d)。

末次给药第 2 天将各组大鼠中的 5 只进行内脏敏感性检查,另 5 只取腹主动脉血,处死大鼠,取食管下端 1 cm 组织,取肛缘 3~5 cm 处长度约 2 cm 的结肠组织。

1.4.2 内脏敏感性测定 按照参考文献方法检测食管内脏最敏感^[15],检测前 24 h 禁食不禁水,予异氟烷吸入麻醉。将针式电极预先植入于大鼠斜方肌上,两处间隔 1 cm。麻醉状态下,将聚乙烯细管(PE 管)置于胃食管交界处上 2~3 cm,固定软管,另一端与注射器(1 mL)相连。将大鼠固定于柔软大鼠固定器中,电极末端与 Medlab 生物信号采集处理系统相连接,记录斜方肌肌电图的变化。待大鼠麻醉清醒后,首先记录大鼠稳定状态下颈斜方肌肌电图波形,截取 1 min 作为基线。然后以约 0.2 mL/min 的速度缓慢推注 pH=1 的盐酸溶液,持续 1 min,观察并记录此时间段下大鼠行为学变化及颈斜方肌肌电图变化。每只大鼠重复 3 次,每次间隔 30 min。分别计算滴酸前后 1 min 内肌电图曲线下面积(area under curve, AUC)。以曲线下面积的变化比值及行为学评分评估各组大鼠

食管内脏敏感性。AUC=滴酸时的 AUC/基础状态的 AUC×100%,取 3 次平均值进行统计分析。

行为学评分标准:大鼠情绪基本稳定,为 0 分;呼吸急促,为 1 分;呻吟,为 2 分;轻度挣扎,为 3 分;剧烈挣扎,为 4 分。

1.4.3 采用苏木精-伊红染色观察组织形态学变化 将大鼠食管下端组织进行石蜡包埋切片,采用苏木精-伊红染色法观察食管组织病理学变化,并进行 RE 病理分级评分,分级标准参考相关文献^[16]。

1.4.4 采用甲苯胺蓝染色检测食管组织中 MC 细胞数目 将食管组织石蜡包埋切片,经常规脱蜡水洗后置于甲苯胺蓝染色液中 40 min,蒸馏水冲洗,将切片浸入 95%乙醇中分色数秒,脱水,二甲苯透明,中性树脂封固。在光学显微镜下观察,肥大细胞细胞核呈蓝色,颗粒呈紫红色,每张切片随机选取 3 个 200 倍视野进行计数,取其均值作统计分析。

1.4.5 采用酶联免疫吸附法检测血清中 LPS、IL-8 的含量 将取材所得的动脉血高速离心,分离血清,按照 LPS 和 IL-8 试剂盒说明书测定各组大鼠血清中 LPS、IL-8 的含量。

1.4.6 采用免疫印迹法检测各组大鼠食管组织 TLR4 蛋白的表达水平 取材所得各组大鼠食管组织,提取总蛋白,参照 BCA 蛋白定量分析试剂盒说明书测定样本总蛋白浓度。采用 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,并转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,封闭,一抗 4℃冰箱孵育过夜(稀释浓度为 TLR4 1:500;GAPDH 1:10 000),TBST 洗膜,二抗孵育,TBST 再次洗膜,ECL 显色曝光。使用 ImageJ 软件进行灰度分析。

1.4.7 采用免疫组织化学染色法检测紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1 和 TPS 的表达水平 将食管或结肠组织石蜡包埋切片,进行脱蜡、水合,Tris-EDTA 缓冲液抗原修复,3% H₂O₂ 室温下孵育 10 min,5%正常山羊血清(TBS 稀释)室温封闭,分别滴加一抗稀释液孵育,TBST 冲洗,滴加适量二抗室温孵育,TBST 再次冲洗,滴加适量 DAB 溶液孵育,显色后迅速蒸馏水冲洗。苏木精复染,脱水,中性树胶封固,光学显微镜下观察拍摄。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件进行数据统计分析。计量资料以 $\bar{X} \pm S$ 表示,数据符合正态分布且方差齐时,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,否则采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠食管黏膜病理表现及评分

对照组、模型组、西药组、中药高剂量组及中药

低剂量组的食管黏膜病理评分分别为 0、1.88 ± 0.64、0.33 ± 0.50、0.56 ± 0.73、0.30 ± 0.67。光镜下,对照组大鼠食管黏膜完整,上皮细胞层内偶见炎症细胞及空泡;模型组大鼠食管组织呈炎症性改变,可见鳞状上皮及基底层不同程度增生,细胞排列紊乱,黏膜固有层乳头延伸,有数量不等的炎性细胞浸润,食管黏膜病理评分较对照组显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。给药干预后,西药组、中药低剂量组及高剂量组食管组织病理表现均明显改善,鳞状上皮轻度增生,黏膜固有层少量的炎性细胞,病理评分较模型组均显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);其中,3个药物干预组之间病理评分差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠行为学评分及颈斜方肌肌电图的 AUC 比较

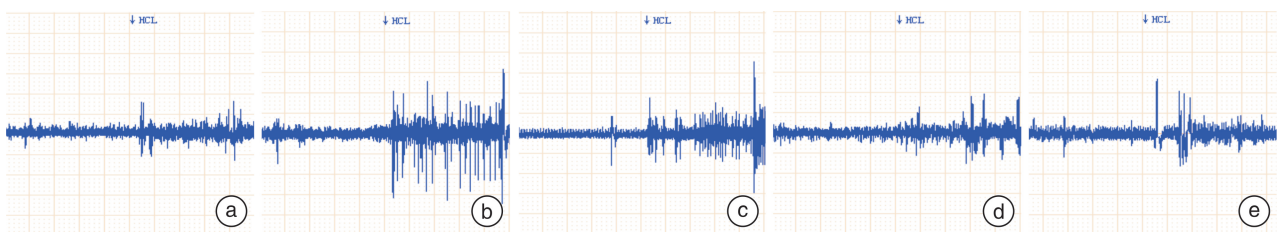
如表 1 所示,模型组大鼠的行为学评分较对照组显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);西药组、中药低剂量组及高剂量组大鼠行为学评分较模型组均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

其中,西药组、中药各组之间行为学评分差异无统计学意义($P > 0.05$)。如表 1 和图 1 所示,与对照组比较,模型组颈斜方肌肌电图 AUC 明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);给药干预后,西药组、中药低剂量组及高剂量组 AUC 较模型组均降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),其中,中药低剂量组及高剂量组效果优于西药组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠行为学评分及颈斜方肌肌电图的 AUC 比较 $\bar{X} \pm S$

组别	例数	行为学评分/分	AUC / %
对照组	5	1.80 ± 0.45	183.02 ± 21.22
模型组	5	3.67 ± 0.24 ¹⁾	350.35 ± 37.39 ¹⁾
西药组	5	2.27 ± 0.43 ²⁾	245.96 ± 25.27 ¹⁾²⁾
中药低剂量组	5	2.00 ± 0.24 ²⁾	208.39 ± 20.89 ²⁾³⁾
中药高剂量组	5	1.87 ± 0.38 ²⁾	197.10 ± 33.24 ²⁾³⁾

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较,²⁾ $P < 0.01$;与西药组比较,³⁾ $P < 0.05$ 。



a:对照组;b:模型组;c:西药组;d:中药低剂量组;e:中药高剂量组。

图 1 各组大鼠颈斜方肌肌电图比较

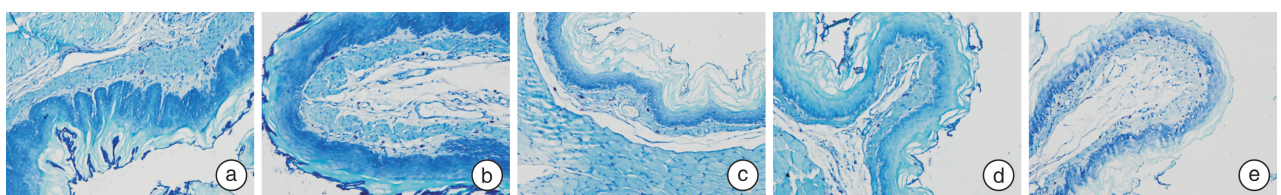
2.3 各组大鼠食管黏膜 MC 数目比较

如表 2 和图 2 所示,与对照组比较,模型组大鼠食管黏膜中 MC 数目均明显增多,差异有统计学意义($P < 0.01$),给药干预后,西药组、中药低剂量组及高剂量组食管黏膜中 MC 数目较模型组均明显减少,差异有统计学意义($P < 0.01$),其中,中药低剂量组及高剂量组大鼠食管黏膜中 MC 数目减少更为显著,与西药组比较均差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠食管黏膜 MC 数目及 TPS 的表达水平 $\bar{X} \pm S$

组别	例数	MC 数目	TPS 表达(MOD 值)
对照组	5	5.00 ± 1.58	0.19 ± 0.03
模型组	5	17.40 ± 0.89 ¹⁾	0.31 ± 0.03 ¹⁾
西药组	5	10.40 ± 1.51 ¹⁾²⁾	0.23 ± 0.03 ²⁾
中药低剂量组	5	7.80 ± 0.84 ¹⁾²⁾³⁾	0.18 ± 0.04 ²⁾³⁾
中药高剂量组	5	8.20 ± 0.84 ¹⁾²⁾³⁾	0.18 ± 0.02 ²⁾³⁾

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较,²⁾ $P < 0.01$;与西药组比较,³⁾ $P < 0.05$ 。



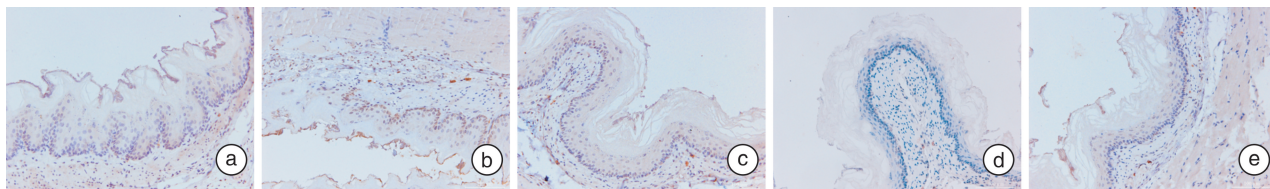
a:对照组;b:模型组;c:西药组;d:中药低剂量组;e:中药高剂量组。

图 2 各组大鼠食管黏膜 MC 甲苯胺蓝染色结果(×200)

2.4 各组大鼠食管黏膜 MC 脱颗粒产物 TPS 的表达水平

如表 2 和图 3 所示,与对照组比较,模型组食管黏膜组织中 TPS 的表达显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,西药组、中药低

剂量组及高剂量组食管黏膜组织中 TPS 的表达显著下降,差异有统计学意义($P < 0.01$),其中,中药低剂量组及高剂量组相较于西药组降低更为显著,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



a:对照组;b:模型组;c:西药组;d:中药低剂量组;e:中药高剂量组。

图 3 各组大鼠食管黏膜 TPS 免疫组织化学染色结果($\times 200$)

2.5 各组大鼠结肠黏膜中紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1 的表达水平

如表 3、图 4、图 5 所示,与对照组比较,模型组大鼠结肠黏膜中 Occludin 与 ZO-1 的表达均显著下调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,西药组、中药低剂量组及高剂量组大鼠结肠黏膜中 ZO-1 的表达均上调,差异有统计学意义($P < 0.05$);中药低剂量及高剂量组大鼠 Occludin 的表达均上调,差异有统计学意义($P < 0.05$),西药组 Occludin 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。中药各组 ZO-1 的促表达作用优于西药组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.6 各组大鼠血清 LPS、IL-8 的含量及食管组织中 TLR4 蛋白的表达水平

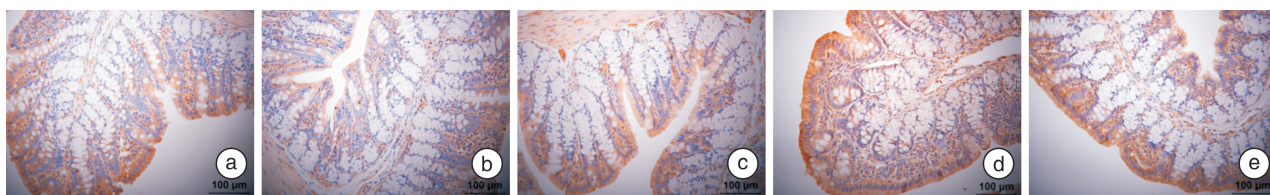
如图 6 所示,与对照组比较,模型组大鼠血清 LPS、IL-8 的含量及食管组织中 TLR4 的表达水平均显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);经西

药、低剂量及高剂量中药治疗后,血清 LPS、IL-8 的含量及食管组织中 TLR4 的水平均较模型组显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。其中,中药高剂量组食管组织中 TLR4 的表达水平明显低于西药组,差异有统计学意义($P < 0.05$),且中药疗效与浓度呈正比。

表 3 各组大鼠结肠黏膜中 ZO-1 及 Occludin 的表达

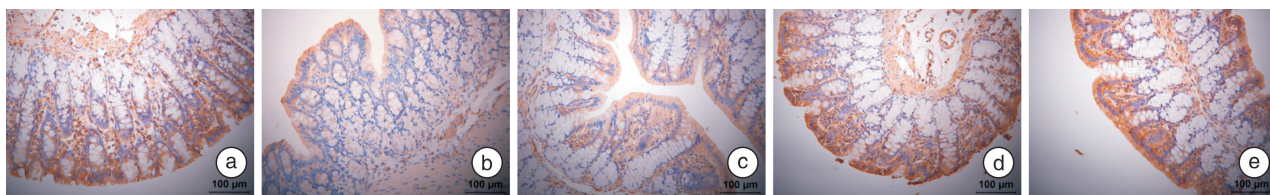
组别	例数	MOD 值, $\bar{X} \pm s$	
		ZO-1 表达	Occludin 表达
对照组	5	0.32 ± 0.03	0.33 ± 0.03
模型组	5	0.24 ± 0.02 ¹⁾	0.25 ± 0.04 ¹⁾
西药组	5	0.27 ± 0.02 ¹⁾²⁾	0.29 ± 0.04
中药低剂量组	5	0.30 ± 0.01 ²⁾³⁾	0.30 ± 0.04 ²⁾
中药高剂量组	5	0.30 ± 0.02 ²⁾³⁾	0.33 ± 0.04 ²⁾

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较,²⁾ $P < 0.05$;与西药组比较,³⁾ $P < 0.05$ 。



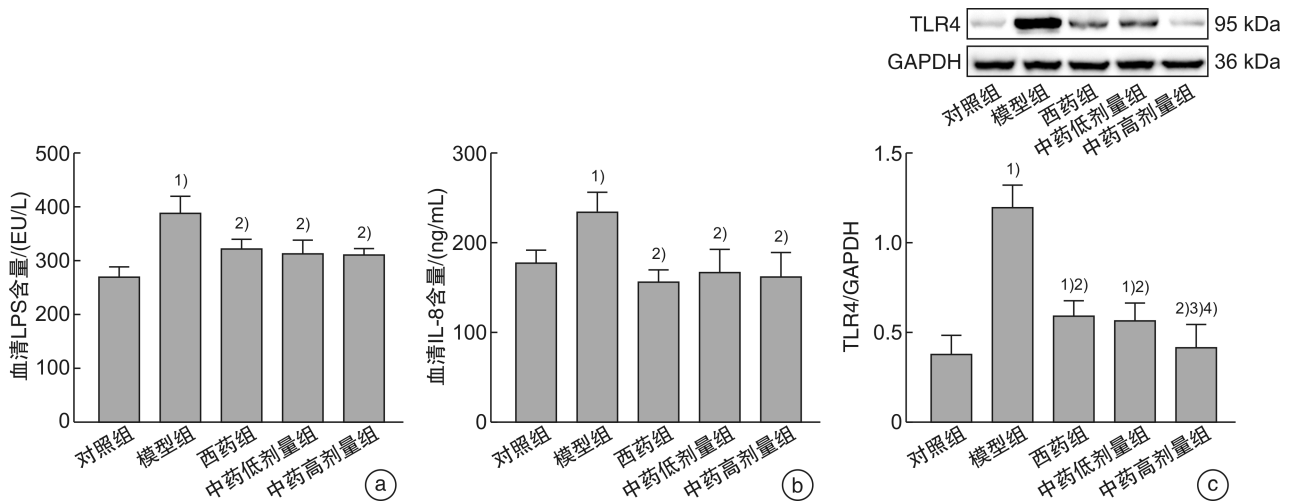
a:对照组;b:模型组;c:西药组;d:中药低剂量组;e:中药高剂量组。

图 4 各组大鼠结肠黏膜中 ZO-1 的表达($\times 200$)



a:对照组;b:模型组;c:西药组;d:中药低剂量组;e:中药高剂量组。

图 5 各组大鼠结肠黏膜中 Occludin 的表达($\times 200$)



a: LPS 的含量; b: IL-8 的含量; c: TLR4 的表达水平。与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$; 与西药组比较, ³⁾ $P < 0.05$; 与中药低剂量组比较, ⁴⁾ $P < 0.05$ 。

图 6 各组大鼠血清中 LPS、IL-8 的含量及食管组织中 TLR4 的表达水平

3 讨论

RE 是临床常见的消化系统疾病之一,目前西医主要以抑酸治疗为主,PPI 或新型抑酸药钾离子竞争性酸阻滞剂(potassium channel acid blocker, P-CAB)是治疗 GERD 的首选药物^[1]。研究发现,高达 40% 的 GERD 患者对 PPI 治疗反应不佳,尽管使用了足量的 PPI 药物,但 GERD 的症状仍间断出现,不仅严重影响了患者的生活质量,也给社会带来了较大的经济和医疗负担^[17]。中医治疗 GERD 具有优势与特色。中医多将其归属于“吐酸”、“食管瘕”等范畴。“胃失和降,胃气上逆”是本病发病的基本病机。气逆、湿热、气郁、血瘀是本病的重要病理基础。最新的 GERD 中医专家诊疗共识意见提出,瘀血阻络证是 6 个主要中医证型之一^[18],也是临床中比例较高的证型之一^[19]。针对瘀血阻络型 RE 的病因病机特点,自拟活血通降方具有活血生肌、和胃降逆、疏肝理气等功效,是治疗瘀血阻络型 RE 的有效方剂。我们前期系列临床研究证实,活血通降方治疗 RE 具有优势,可有效缓解临床症状,提高治愈率,且对难治性 RE 疗效明显^[20-21]。

难治性 RE 的病理机制尚不明确,目前认为与食管免疫炎症、夜间酸突破、弱酸或非酸反流、食管内脏高敏感、精神心理因素等多种因素相关^[22]。其中,食管内脏高敏感可能是难治性 RE 症状持续的基础^[17]。在双倍剂量 PPI 治疗无效的患者中,高达 36%~38% 的患者存在食管内脏高敏感,生理性的酸或非酸反流即可使患者产生反酸、烧心等症状^[23]。本研究发现,RE 大鼠食管对滴酸刺激的敏感性明显增高,而活血通降方干预可显著降低滴酸刺激的食管敏感性,提示活血通降方在修复食管黏膜损伤的同时,还可明显改善食管内脏高敏

感症状。

研究证实,肠道菌群紊乱可通过“微生物-肠-脑”轴参与内脏高敏感的形成^[23]。我们前期多项研究均显示,RE 存在肠道菌群的紊乱,主要表现为菌群的物种丰度与多样性均降低,革兰阴性菌未分类拟杆菌属、普雷沃菌 UCG-003、螺杆菌属等的富集,有益菌 Akkermansia 菌属及未分类瘤胃菌科丰度降低^[6,24]。肠道菌群紊乱会导致肠道黏膜屏障功能受损,本次研究发现,RE 大鼠肠道黏膜紧密连接蛋白 Occludin 与 ZO-1 的表达水平亦有明显下降,进一步证实 RE 可能存在肠道屏障功能的受损。肠道黏膜屏障功能受损可使致病菌及代谢产物 LPS 等更容易进入肠黏膜及循环系统,引起炎症反应及免疫细胞的增殖与活化,激活内脏高敏感产生的外周敏化机制^[25]。本研究同时发现,活血通降方可显著上调结肠黏膜中 ZO-1 及 Occludin 的表达和降低外周血 LPS 的水平,其作用明显优于西药。提示活血通降方不仅可以调节肠道菌群,降低革兰阴性菌水平,而且还可以显著改善肠道黏膜屏障功能。

MC 是机体中重要的免疫细胞,其增殖、活化及脱颗粒可释放多种生物活性递质(包括 TPS、炎性递质如 IL-8 等),不仅参与免疫炎症过程,改变黏膜通透性,还可与神经细胞相互作用,兴奋、敏化伤害性神经纤维,引起感觉过敏,参与内脏高敏感的形成机制^[8-9]。LPS 可通过激活 TLR4 介导 MC 增殖、活化脱颗粒^[26]。为进一步探究 RE 食管黏膜 MC 增殖活化的机制以及中药的作用,本实验测定了食管黏膜 MC 数目及脱颗粒产物 TPS,同时检测血清 LPS 的含量及食管组织中 TLR4 的表达水平。结果显示,RE 大鼠血清 LPS、IL-8 的含量明显增加,食管组织 TLR4 的表达水平明显上调,食

管黏膜 MC 数目明显增加,脱颗粒产物 TPS 明显增多。活血通降方干预可以降低血清 LPS、IL-8 含量及食管组织 TLR4 的表达,同时可降低食管黏膜中 MC 的数目及 TPS 的表达水平。此结果进一步验证了我们的假设,活血通降方可通过改善肠黏膜屏障功能,降低血清 LPS 的水平,抑制 LPS-TLR4 通路激活及食管 MC 活化脱颗粒,从而抑制食管黏膜免疫炎症和改善食管内脏高敏感。

此外,胃肠疾病的内脏高敏感变化并不是器官特异性的,存在内脏-内脏感觉过敏机制。这是由于中枢神经系统的二级神经元可接受来自不同内脏器官的会聚输入,内脏器官之间存在交叉敏化的现象^[27]。研究发现,对食管进行酸灌注刺激后,食管、十二指肠和直肠 3 个部位对机械刺激的整体敏感性均增加,尤其是直肠部位敏感性增加的更为明显^[28-29]。

4 结论

本研究结果提示,RE 大鼠食管内脏高敏感与肠黏膜屏障功能受损所致的 LPS/TLR4/MC 信号通路激活相关。另外,肠道来源的 LPS 是否可以激活肠黏膜 LPS/TLR4/MC 信号通路诱导结肠内脏高敏感值得进一步深入探究,这也可进一步解释 GERD 多与功能性肠病重叠的现象。但目前关于肠道菌群与 RE 的相关研究尚处于早期探索阶段,RE 造成肠道菌群失调和肠屏障破坏的机制及肠道菌群与内脏高敏感的相关性均有待进一步深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 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.
- [2] Richter JE, Rubenstein JH. Presentation and epidemiology of gastroesophageal reflux disease[J]. Gastroenterology, 2018, 154(2): 267-276.
- [3] Tang YP, Li PC, Liu X, et al. A single-center retrospective study on epidemiological and Traditional Chinese Medicine syndrome characteristics of 21010 patients with reflux/heartburn symptoms[J]. J Tradit Chin Med, 2023, 43(3): 574-581.
- [4] Fock KM, Talley N, Goh KL, et al. Asia-Pacific consensus on the management of gastro-oesophageal reflux disease: an update focusing on refractory reflux disease and Barrett's oesophagus[J]. Gut, 2016, 65(9): 1402-1415.
- [5] Zhou J, Shrestha P, Qiu ZG, et al. Distinct microbiota dysbiosis in patients with non-erosive reflux disease and esophageal adenocarcinoma[J]. J Clin Med, 2020, 9(7): 2162.
- [6] 尹红, 唐艳萍, 杨磊, 等. 活血通降方对反流性食管炎大鼠肠道菌群及 Caspase-3/GSDME 通路的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2022, 30(10): 701-707, 712.
- [7] 曹战江, 于健春, 康维明, 等. 肥胖症肠道菌群与炎症的研究进展[J]. 中国医学科学院学报, 2013, 35(4): 462-465.
- [8] Kirshenbaum AS, Swindle E, Kulka M, et al. Effect of lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PGN) on human mast cell numbers, cytokine production, and protease composition[J]. BMC Immunol, 2008, 9(1): 1-13.
- [9] Yang J, Shang BX, Shi HT, et al. The role of toll-like receptor 4 and mast cell in the ameliorating effect of electroacupuncture on visceral hypersensitivity in rats[J]. Neurogastroenterol Motil, 2019, 31(6): e13583.
- [10] 刘琰, 唐艳萍, 刘磊, 等. 活血通降方对反流性食管炎模型大鼠食管动力、血清炎症因子及食管下括约肌 SCF/c-kit 信号通路的影响[J]. 中医杂志, 2022, 63(3): 269-275.
- [11] 刘磊, 唐艳萍, 弓艳霞, 等. 活血通降方对反流性食管炎大鼠食管黏膜 NF- κ B/MAPK 信号转导通路的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2021, 27(4): 555-562.
- [12] Liu S, Tang Y, Liu L, et al. Proteomic analysis reveals that ACSL4 activation during reflux esophagitis contributes to ferroptosis-mediated esophageal mucosal damage[J]. Eur J Pharmacol, 2022, 931: 175175.
- [13] Tang YP, Liu L, Liu X, et al. Comparison and evaluation of acid reflux esophagitis animal models[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2021, 26(12): 1599-1606.
- [14] 李培彩, 卢小芳, 张声生, 等. 腹泻型肠易激综合征大鼠模型的评价研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2016, 24(3): 174-177.
- [15] Han X, Zhang YW, Lee A, et al. Upregulation of acid sensing ion channels is associated with esophageal hypersensitivity in GERD[J]. FASEB J, 2022, 36(1): e22083.
- [16] 陆星华, 张泰昌. 反流性食管炎诊断及治疗指南(2003 年)[J]. 中华消化内镜杂志, 2004, 21(4): 221-222.
- [17] Zerbib F, Bredenoord AJ, Fass R, et al. ESNM/ANMS consensus paper: diagnosis and management of refractory gastro-esophageal reflux disease[J]. Neurogastroenterol Motil, 2021, 33(4): e14075.
- [18] 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.
- [19] 李培彩, 唐艳萍. 胃食管反流病中医证候、证素分布特点的文獻研究[J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(4): 86-89.
- [20] 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(7): 485-490.
- [21] 康丽丽, 唐艳萍, 杨莉, 等. 活血通降方对瘀血阻络型反流性食管炎临床疗效及胃排空的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2020, 26(4): 635-640.

- 29(12):e13104.
- [9] Vanner S, Greenwood-van Meerveld B, Mawe G, et al. Fundamentals of neurogastroenterology: basic science [J]. *Gastroenterology*, 2016; S0016-S5085 (16) 00184-0.
- [10] Katzka DA, Kahrilas PJ. Advances in the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease [J]. *BMJ*, 2020, 371:m3786.
- [11] Paul S, Abbas MS, Nassar ST, et al. Correlation of anxiety and depression to the development of gastroesophageal disease in the younger population [J]. *Cureus*, 2022, 14(12):e32712.
- [12] Caballero-Mateos AM, Lopez-Hidalgo JL, Torres-Parejo U, et al. Risk factors for functional dyspepsia, erosive and non-erosive gastroesophageal reflux disease: a cross-sectional study [J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2022; S0210-S5705(22)00314-4.
- [13] Yang F, Xie XH, Li X, et al. Analysis of psychological and gut microbiome characteristics in patients with non-erosive reflux disease [J]. *Front Psychiatry*, 2021, 12:741049.
- [14] Inatomi N, Matsukawa J, Sakurai Y, et al. Potassium-competitive acid blockers: advanced therapeutic option for acid-related diseases [J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 168:12-22.
- [15] 王鹏, 戴倩倩, 陈海啸. 质子泵抑制剂与骨折风险相关性及其机制的研究进展 [J]. *实用药物与临床*, 2021, 24(6):569-571.
- [16] Min YW, Shin YW, Cheon GJ, et al. Recurrence and its impact on the health-related quality of life in patients with gastroesophageal reflux disease: a prospective follow-up analysis [J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2016, 22(1):86-93.
- [17] 姜礼双, 崔亚, 乔大伟, 等. 110例非糜烂性胃食管反流病患者中医证候特征分析 [J]. *光明中医*, 2018, 33(5):608-613.
- [18] 孙永顺, 朱生樑, 王宏伟, 等. 疏肝和胃方治疗难治性胃食管反流病的临床观察 [J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(10):2457-2459.
- [19] 陈天红, 朱建军. 蒙特利尔定义与 RDQ 评分对胃食管反流病的诊断价值 [J]. *实用医学杂志*, 2012, 28(18):3069-3071.
- [20] 刘凡, 李双翼, 郭洁, 等. 中药复方治疗非糜烂性胃食管反流病的随机对照试验系统评价与 Meta 分析 [J]. *世界中医药*, 2022, 17(15):2127-2134.
- [21] 周金池, 窦维佳, 魏延, 等. 中国胃食管反流病患者焦虑抑郁患病率的 Meta 分析 [J]. *中国全科医学*, 2021, 24(5):608-613.
- [22] Wong MW, Liu TT, Yi CH, et al. Oesophageal hypervigilance and visceral anxiety relate to reflux symptom severity and psychological distress but not to acid reflux parameters [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2021, 54(7):923-930.
- [23] Taft TH, Triggs JR, Carlson DA, et al. Validation of the oesophageal hypervigilance and anxiety scale for chronic oesophageal disease [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2018, 47(9):1270-1277.
- [24] 李林, 吕华, 万爱华, 等. 抑郁障碍中医证素分布特点分析 [J]. *河北中医*, 2022, 44(12):1984-1989.

(收稿日期:2023-04-19)

(上接第 544 页)

- [22] Norita K, Asanuma K, Koike T, et al. Impaired mucosal integrity in proximal esophagus is involved in development of proton pump inhibitor-refractory non-erosive reflux disease [J]. *Digestion*, 2021, 102(3):404-414.
- [23] Clarrett DM, Hachem C. Management of gastroesophageal reflux disease [J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(2):302-318.
- [24] 朱佳杰, 于红, 马继征, 等. 肠道菌群在肠易激综合征内脏高敏感中的作用 [J]. *中华消化杂志*, 2019, 39(9):641-643.
- [25] 王萍, 郑小领, 宋洁, 等. 胃食管反流患者肠道菌群、炎症变化及其与 UCP2 基因多态性的关系 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2020, 19(19):2049-2053.
- [26] Caslin HL, Kiwanuka KN, Haque TT, et al. Controlling mast cell activation and homeostasis: work influenced by Bill Paul that continues today [J]. *Front Immunol*, 2018, 9:868.
- [27] Brumovsky PR, Gebhart GF. Visceral organ cross-sensitization, an integrated perspective [J]. *Auton Neurosci*, 2010, 153(1-2):106-115.
- [28] Frokjær JB, Andersen SD, Gale J, et al. An experimental study of viscerovisceral hyperalgesia using an ultrasound-based multimodal sensory testing approach [J]. *Pain*, 2005, 119(1-3):191-200.
- [29] Freede M, Leasure AR, Proskin HM, et al. Comparison of rectal and esophageal sensitivity in women with functional heartburn [J]. *Gastroenterol Nurs*, 2016, 39(5):348-358.

(收稿日期:2023-04-22)