降逆清热化浊方对非糜烂性胃食管反流病大鼠模型食管组织降钙素基因相关肽的影响

邱新萍[1]　陈瑞琳[2,3]　周　滔[2]　李长新[1]　牛柯敏[1]　杨仲婷[2,3]　殷秀雯[2,3]　马万千[1]

（1 北京中医医院顺义医院，北京，101300；2 首都医科大学附属北京中医医院，北京，100010；3 北京中医药大学，北京，100029）

摘要　目的：观察降逆清热化浊方对非糜烂性胃食管反流病（NERD）大鼠模型食管组织降钙素基因相关肽（CGRP）的影响。方法：选取 SD 雄性大鼠 60 只并将其分为正常组、模型组、西药组和中药组。以鸡卵清蛋白/氢氧化铝基础致敏联合食管酸灌注的方法制备 NERD 大鼠模型，药物干预 14 d 后，观察各组大鼠食管组织的病理改变及高敏感性相关信号分子 CGRP 的表达情况。结果：与正常组比较，模型组大鼠食管组织上皮细胞间隙增宽，有少量炎性细胞；与模型组比较，中药组、西药组大鼠食管组织 CGRP 表达明显降低，且中药组降低更为显著。结论：降逆清热化浊方通过抑制 CGRP 的表达，下调食管高敏感性，从而对 NERD 起到治疗作用。

关键词　胃食管反流；降逆清热化浊方；食管高敏感性；大鼠；降钙素基因相关肽；上皮细胞

Study of Effects on Jiangni Qingre Huazhuo Prescription on Calcitonin Gene Related Peptide in Rats with Non-erosive Gastroesophageal Reflux Disease

Qiu Xinping[1], Chen Ruilin[2,3], Zhou Tao[2], Li Changxin[1], Niu Kemin[1], Yang Zhongting[2,3], Yin Xiuwen[2,3], Ma Wanqian[1]

(1 *Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine Shunyi Branch*, *Beijing* 101300, *China*; 2 *Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine*, *Capital Medical University*, *Beijing* 100010, *China*; 3 *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 100029, *China*)

Abstract　**Objective**: To observe the effects of Jiangni Qingre Huazhuo Prescription on the esophageal tissue CGRP in rats with non-erosive gastroesophageal reflux disease (NERD). **Methods**: Sixty male SD rats were divided into the normal group, model group, western medicine group and Chinese medicine group. The NERD rat model was prepared by chicken ovalbumin/aluminum hydroxide sensitization combined with esophageal acid perfusion. After 14 days of drug intervention, the pathological changes of esophageal tissue and the calcitonin gene related peptide (CGRP) of high-sensitivity-related signaling molecule was observed. **Results**: Compared with the normal group, the esophageal tissue epithelial cells in the model group were widened and a small amount of inflammatory cells were present. Compared with the model group, the expression of CGRP in the esophageal tissue of the rats in the Chinese medicine group and the western medicine group was significantly reduced. The decreased range of Chinese medicine group was more significant than that of the western medicine group. **Conclusion**: Jiangni Qingre Huazhuo Prescription can get therapeutic effects of non-erosive gastroesophageal reflux disease by inhibiting expression of CGRP and down-regulate the high sensitivity of esophagus.

Key Words　Gastroesophageal reflux; Jiangni Qingre Huazhuo Prescription; Esophageal hypersensitivity; Rats; Calcitonin gene related peptide; Epithelial cells

中图分类号：R289.5；R573.9　　**文献标识码**：A　　**doi**：10.3969/j.issn.1673－7202.2019.03.019

胃食管反流病（Gastroesophageal Reflux Disease，GERD）是胃内容物反流入食管、口腔所引起的，以反酸、烧心、吞咽疼痛为主要不适症状的一种疾病[1]。其中，具有胃食管反流引起的不适症状，且近期未予以抑酸治疗，内镜下未发现食管黏膜损伤的一种 GERD 亚型为非糜烂性胃食管反流病（Non-erosive Gastroesophageal Reflux Disease，NERD），又称内镜阴性胃食管反流病，占 GERD 的 50% ~ 70%[2-3]。NERD 的发病机制较为复杂，目前多认为与酸反流、非酸相关性刺激、内脏高敏感等相关[4-5]。NERD 根据其临床特征可归入中医学“反酸”“嘈杂”等范畴。中医认为其主要病机为“胃气上逆、胃火炽盛、浊邪上泛”，故治疗当以降逆清热化浊为主[6]。本研究主要通过建立食管高敏感性 NERD 大鼠模型，观察降

基金项目：第四批全国中医（临床、基础）优秀人才研修项目（国中医药人教发[2017]24 号）；北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划（2015-3-114）；北京中医医院-北京中医医院顺义医院两院合作科研项目（SYYJ201502）

作者简介：邱新萍（1977.11—），女，博士研究生，主任医师，研究方向：中西医结合治疗脾胃病、风湿病，E-mail：59442016@qq.com

通信作者：周滔（1974.09—），男，博士，主任医师，研究方向：中西医结合消化病临床与基础研究，E-mail：zhoutao0903@126.com

逆清热化浊方干预下 NERD 大鼠食管高敏感性相关信号分子的表达情况，以探讨降逆清热化浊方对 NERD 食管高敏感性的影响及其治疗 NERD 的作用机制。

1 材料

1.1.1 动物 选取雄性 SD 大鼠 60 只，SPF 级，体质量 150 ~ 160 g，动物批号为 11401500034143，购自斯贝福（北京）生物技术有限公司，自由摄食与饮水。自由摄食与饮水，饲养 3 d，待大鼠适应环境后开始试验。

1.1.2 药物 降逆清热化浊方由柴胡 12 g、白芍 10 g、枳实 15 g、厚朴 15 g、陈皮 10 g、吴茱萸 3 g、黄连 10 g 等药物组成，中药颗粒剂购自广东一方制药有限公司。奥美拉唑肠溶片购自山东新时代药业有限公司，国药准字 H20044871。

1.1.3 试剂与仪器 试剂：OVA 鸡蛋清白蛋白，购自 Bioruler 百奥百乐生物科技有限公司；抗大鼠 CGRP 多克隆抗体，购自 Proteintech 公司；抗大鼠 P 物质多克隆抗体，购自艾博抗（上海）贸易有限公司；氢氧化铝、乌拉坦，购自美国 Sigma 公司。

仪器：台式高速离心机，购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。奥林巴斯 BX41 显微镜，购自日本 Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 分组：将 60 只大鼠随机分为 4 组，即正常组、模型组、中药组、西药组，每组 15 只。其中模型组、中药组及西药组大鼠均在实验第 1 天予以卵清蛋白/氢氧化铝混合液行腹腔注射，正常组大鼠予等量生理盐水行腹腔注射。从实验第 2 天开始，中药组、西药组大鼠分别予以疏肝和胃方（0.625 g/mL，相当于成人用药量 5 倍）及奥美拉唑溶液（0.167 mg/100 g 体质量，相当于成人用药量 5 倍）10 mL/kg 体质量灌胃，正常组和模型组大鼠均予以等量生理盐水（10 mL/kg 体质量）灌胃。连续给药 2 周，至第 14 天结束给药，并进行食管酸灌注，采集大鼠食管标本进行相关实验检测。

食管高敏感性的 GERD 大鼠模型的制备[7]：选择鸡卵清蛋白/氢氧化铝基础致敏联合食管酸灌注的方法制备内脏高敏感性 NERD 大鼠模型。在实验第 1 天即用卵清蛋白和氢氧化铝佐剂的混合液 1.5 mL（卵清蛋白 100 mg/氢氧化铝 200 mg）行腹腔注射，进行基础致敏；在实验第 14 天进行食管酸灌注。

食管酸灌注方法如下：酸灌注前禁食 24 h，予以 10% 乌拉坦（8 mL/kg）麻醉，大鼠麻醉后将头部抬高 20° ~ 30° 平卧固定；切开腹壁暴露胃壁，并在近贲门处切一小圆孔，通过小圆孔放置引流管，用以收集从灌注的液体；将一单腔灌流管一端经口置食管内，并固定在食管和胃交界处上 2 ~ 3 cm 处，另一端与持续灌注泵相连，使用 0.1 mol/L 盐酸以 10 mL/h 的速度滴注 50 min。

1.2.2 干预方法 中药组：疏肝和胃方（0.625 g/mL，相当于成人用药量 5 倍），10 mL/kg 体质量灌胃；西药组：奥美拉唑溶液（0.167 mg/100 g 体质量，相当于成人用药量 5 倍）10 mL/kg 体质量灌胃；正常组和模型组：生理盐水 10 mL/kg 体质量灌胃。

1.2.3 检测指标与方法 大鼠食管组织病理学检测：自贲门向口腔方向剪取 1 cm 左右长度的食管组织，用 10% 中性甲醛固定，依次进行乙醇梯度脱水，二甲苯透明，石蜡包埋。切片厚度为 4 μm，常规苏木精-伊红（HE）染色。镜下观察食管组织病理学改变。

大鼠食管组织 CGRP 水平检测：大鼠食管组织石蜡切片，常规脱蜡，柠檬酸高压热修复 2.5 min，过氧化氢作用 10 min 阻断内源性过氧化物酶，加入大鼠 CGRP 抗体（抗体浓度 1∶50），在 37 ℃ 条件下孵育 1 h，加入酶标羊血清抗小鼠/兔二抗，在室温下孵育 20 min，最后用二氨基联苯胺（DAB）显色。镜下读片，棕褐色团块即为 CGRP 阳性表现。

2 结果

2.1 一般情况 正常组大鼠的行为活跃，体质量正常增加；与正常组比较，模型组大鼠的体质量增加较少、精神萎靡、行为不活跃，而中药组和西药组大鼠体质量稍增加，精神稍差，活动尚可。

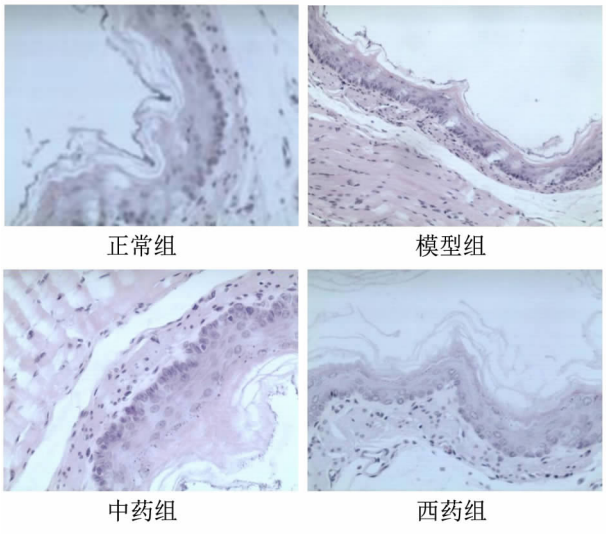

图 1 各组大鼠食管组织病理学表现（HE 染色，×400）

2.2　大鼠食管组织病理学　模型组、中药组、西药组大鼠食管黏膜除上皮细胞层内有少量淋巴细胞外,均未见鳞状上皮增生和黏膜糜烂等明显病理变化;正常组大鼠黏膜上皮细胞层内未见炎性细胞浸润及明显病理变化。见图 1。

2.3　大鼠食管组织 CGRP 表达　与正常组比较,模型组大鼠食管组织 CGRP 阳性表达明显增多;与模型组比较,中药组与西药组大鼠食管组织 CGRP 阳性表达均有明显减少,且中药组减少更为显著。见图 2。

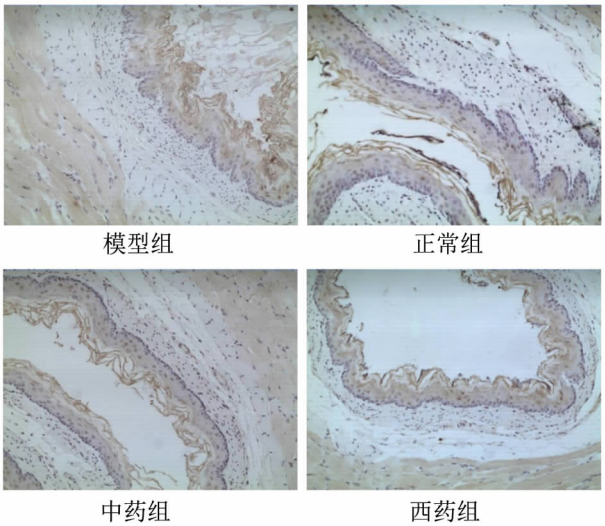

图 2　各组大鼠食管组织 CGRP 表达情况(HE 染色,×200)

3　讨论

NERD 根据其烧心、反酸、嗳气、胸骨后灼痛、咽部如有梗死感等症状临床特征可归入中医学“吞酸”“嘈杂”等范畴。《素问·至真要大论》曰:“诸呕吐酸,皆属于热”。《灵枢·四时气论》云:“善呕,呕有苦……邪在胆,逆在胃,胆液泄则口苦,胃气逆则呕苦”。《素问玄机原病式·吐酸》云:“酸者,肝木之味也。由火盛制金,不能平木,则肝木自甚,故为酸也”。诸多医家认为 NERD 病机属热,与肝、胆、胃有关。关于病因,中医认为该病多由情志失调、饮食不节、素体脾胃虚弱等所致。《血证论》载:“木之性主疏泄,食气入胃,全赖肝木之气以疏泄之,而水谷乃化”。肝属木,脾胃属土,五行生克制化,肝木克土,当情志失调,肝气郁滞,或气郁化火,肝火亢盛,则伤脾胃,脾胃失和,胃气上逆而发病。肝胆同处膈下,互为表里,在生理上相互依赖,在病理上相互影响,胆经受邪亦会影响肝经疏泄;或饮食不节,嗜食肥甘厚腻,致痰湿内生,阻滞气机,脾胃升降失常;或素体脾胃虚弱,或久病伤及脾胃,土虚木乘,运化失常,故该病位在食管,属脾胃所主,但与肝、胆关系密切。

马万千主任医师认为,NERD 的主要病机为肝失疏泄,气滞化热犯胃,胃气上逆,脾胃升降失常,运化失司,浊邪内生并随气逆上泛,其中“胃气上逆、胃火炽盛、浊邪上泛”为病机关键[6]。以此为依据,并结合多年临床经验,马万千主任医师提出治疗 NERD 当以“降逆”为切入点,以“降逆疏肝、清热化浊”为主要大法,自拟降逆清热化浊方,药用柴胡、白芍、枳实、厚朴、陈皮、吴茱萸、黄连、甘草、苍术等,临床疗效显著。《素问·六元正纪大论》曰:“木郁达之”。与反流性食管炎比较,NERD 患者有更明显的焦虑倾向,生命质量和心理健康程度也偏低。当今社会环境下,人们承受着越来越大的生活和工作压力,出现焦虑与抑郁等情志不畅者日益增加,NERD 的患者也逐渐增多。焦虑和抑郁等情绪都与肝失疏泄明显相关,故拟方首选柴胡利肝胆、疏肝解郁,白芍敛阴柔肝,厚朴以温中下气,枳实破气消积,同为降逆之品,降逆疏肝,肝脾同治;“见肝之病,知肝传脾,当先实脾”。故同时配伍陈皮健脾顺气,苍术燥湿健脾;肝郁日久,容易化火生热,亦配伍黄连清脾胃之火,吴茱萸以防寒凉之品遏伤脾胃之阳,诸药合用共奏降逆疏肝,清热和胃之效。

西医治疗 NERD 的主要药物包括质子泵抑制剂(PPI)、胃肠动力药等,但临床上存在很大一部分患者在服用 PPI 后,反酸、烧心等症状并不能得到有效缓解。且西药目前尚存在用药较为单一,不良反应较为明显,而患者的生命质量及焦虑抑郁等情况改善并不十分理想等不足之处,且长期维持用药给患者及家庭造成了巨大的经济负担。中医药治疗 NERD 具有一定的优势和特色。在上述马万千主任医师对 NERD 病机认识和组方用药的相关思想指导下,我们前期临床观察降逆清热化浊方(柴胡 12 g、白芍 10 g、枳实 15 g、厚朴 15 g、陈皮 10 g、吴茱萸 3 g、黄连 10 g、甘草 10 g、苍术 10 g 等)治疗肝胃不和型 NERD 患者 60 例,总有效率 98%,且在 RDQ 评分、中医证候积分、主要单项症状计分、生命质量量表积分等方面的改善明显优于口服雷贝拉唑肠溶胶囊治疗的对照组($P<0.05$),证明了降逆清热化浊方的临床疗效[8]。本研究探讨及验证降逆清热化浊方治疗 NERD 的作用机制,明确中医药治疗该病的疗效及优势,以期在临床上更广泛应用及推广。

NERD 的发病机制尚未十分明确,现代医学多认为其与食管清除能力下降、食管及胃排空功能障碍、内脏高敏感及情志等因素相关。但临床应用 PPI

治疗 NERD 患者的疗效反馈通常不佳,对 NERD 患者食管 24 h 反流监测结果显示,大部分患者的酸反流属于生理范围。由此推测,胃酸并非 NERD 的主要致病因素,可能与食管高敏感性相关,故即使是生理量的反流物也可导致食管高敏感性的 NERD 患者产生反酸、烧心等症状。

目前已有较多研究证实食管内脏高敏感性可能是 NERD 重要的病理生理基础。内脏高敏感性(Visceral Hypersensitivity, VH)是指内脏对疼痛或刺激的感知阈值降低,对生理性刺激产生不适感或对伤害性刺激反应强烈。NERD 患者对食管酸刺激、机械性刺激、胆碱能药物的敏感性增强,即为食管高敏感性。注:降钙素基因相关肽(Calcitonin Gene Related Peptide, CGRP)是重要的感觉神经递质,降低疼痛阈值,增加内脏敏感性[8]。CGRP 即是食管高敏感性相关的重要信号分子之一,CGRP 是重要的感觉神经递质,降低疼痛阈值,增加内脏敏感性。CGRP 含量的增加可引起食管黏膜的神经末梢处于兴奋状态,并导致"神经源性炎症",从而使局部微环境发生改变,引起患者痛觉过敏[9]。有研究显示,CGRP 在 NERD 患者的食管黏膜中高表达[10]。CGRP 是外周神经系统中,参与痛觉信息传递的重要神经递质。食管的支配神经发出大量纤维末梢分布于食管壁全层,这些末梢中含有大量的 CGRP。食管受到刺激后,信号传入引起 CGRP 等神经活性物质释放,作用于相应神经支配区使肥大细胞脱颗粒而释放各种细胞因子及炎性反应递质,引起血管扩张,通透性增加,血浆蛋白外渗等神经源性炎性反应,导致内脏感知阈值下降,即食管内脏高敏感性[11-13]。张秀莲[14]分别测定 CERD 患者及正常人食管黏膜中 CGRP 的含量,结果显示 CERD 患者食管组织中 CGRP 的表达较正常人明显增多,从而推测 NERD 的食管高敏感性与 CGRP 高表达相关。牛小平等[15]分别检测 CERD 患者及正常人血清中 CGRP 的含量,检测结果显示 NERD 患者血清 CGRP 表达水平明显高于正常对照组($P<0.05$);且 CGRP 表达水平与 GerdQ 评分呈正相关,由此可知 NERD 患者血清 CGRP 表达明显增加,与反流症状严重程度呈正相关,CGRP 参与了 NERD 的病理过程,是其内脏高敏性的重要机制。

综上所述,模型组大鼠的食管组织上皮细胞层内存在炎性细胞,与 NERD 的病理学变化相符。中药组及西药组大鼠食管组织病理改变减轻,表明降逆清热化浊方对 NERD 具有明确的治疗效果。且降逆清热化浊方能够显著降低 NERD 模型大鼠食管组织中 CGRP 的表达,对其食管高敏感性具有明显的抑制作用。由此可以得出结论,降逆清热化浊方可能是通过下调食管 CGRP 的表达,降低食管高敏感性从而对 NERD 起到治疗作用。但本实验关于食管高敏感性的研究较为单一,有待更深入的研究,以明确中医药的作用机制及优势环节,充分发挥中医药的价值。

参考文献

[1] Katz PO, Gerson LB, Vela MF. Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease[J]. Am J Gastroenterol, 2013, 108(3): 308-328; quiz 329.

[2] Zentilin P, Marabotto E, Pellegatta G, et al. Complexity and diversity of gastroesophageal reflux disease phenotypes[J]. Minerva Gastroenterol Dietol, 2017, 63(3): 198-204.

[3] Zou D, He J, Ma X, et al. Epidemiology of symptom-defined gastroesophageal reflux disease and reflux esophagitis: the systematic investigation of gastrointestinal diseases in China(SILC)[J]. Scand J Gastroenterol, 2011, 46(2): 133-141.

[4] 崔荣丽,周丽雅,林三仁,等. 光学显微镜测量胃食管反流病患者食管下段细胞间隙的临床价值[J]. 中华消化内镜杂志, 2011, 28(1): 1-4.

[5] 陈文科,邹兵,郑爱萍,等. 光学显微镜下非糜烂性反流病食管远端上皮细胞间隙的变化[J]. 中国实用医药, 2016, 11(7): 19-20.

[6] 邱新萍,周滔,马万千. 马万千降逆清热化浊法治疗非糜烂性胃食管反流病经验[J]. 北京中医药, 2016, 35(1): 55-56.

[7] 杨敏,陈东风,房殿春. 食管内脏高敏感性动物模型的建立和评价[J]. 局解手术学杂志, 2008, 17(2): 77-79.

[8] 牛柯敏,周滔,邱新萍,等. 降逆清热化浊方治疗肝胃不和型非糜烂性反流病的疗效评价[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(7): 3180-3182.

[9] 刘芳薇,洪炎国. 降钙素基因相关肽家族在疼痛和阿片耐受中的作用[J]. 生理学报, 2013, 65(3): 347-354.

[10] Xu X, Li Z, Zou D, et al. High expression of calcitonin gene-related peptide and substance P in esophageal mucosa of patients with non-erosive reflux disease[J]. Dig Dis Sci, 2013, 58(1): 53-60.

[11] 孟庆伟,许树长. 食管内脏高敏感及其相关研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(7): 568-573.

[12] Yoshida N, Kuroda M, Suzuki T, et al. Role of nociceptors/neuropeptides in the pathogenesis of visceral hypersensitivity of nonerosive reflux disease[J]. Dig Dis Sci, 2013, 58(8): 2237-2243.

[13] 孔炫,许树长. 食管内脏高敏感与神经递质、离子通道及受体[J]. 国际消化病杂志, 2009, 29(2): 111-113.

[14] 张秀莲. 食管黏膜 SP、CGRP 参与非糜烂性胃食管反流病发生的敏感化机制研究[C]. 贵阳:中华中医药学会脾胃病分会第二十五届全国脾胃病学术交流会, 2013: 3.

[15] 牛小平,刘少锋,汪润芝. 非糜烂性反流病患者血清 P 物质、降钙素基因相关肽的表达及意义[J]. 皖南医学院学报, 2014, 33(3): 205-206, 211.

(2018-12-20 收稿 责任编辑:杨觉雄)