

基于 PKA/TRPV1 信号通路探讨降逆通腑方对非糜烂性反流病大鼠内脏高敏感性的影响

李佩芳¹, 杨丹^{2#}, 李廷荃^{1*}, 芦文静¹, 申叶飞²

(1. 山西中医药大学附属医院脾胃科, 山西 太原 030024; 2. 山西中医药大学, 山西 太原 030024)

摘要: 目的 探讨降逆通腑方对非糜烂性反流病 (NERD) 大鼠内脏高敏感性的影响。方法 大鼠随机分为空白组、模型组、多潘立酮组 (0.31 mg/kg) 和降逆通腑方低、中、高剂量组 (6.75、13.5、27 g/kg), 每组 6 只, 除空白组外, 其余各组使用幽门半结扎手术法联合胃底结扎术构建 NERD 模型, 造模后每天灌胃给药, 持续 4 周。给药结束后, 使用 pH 仪测定大鼠食管 pH 值; 痛觉行为实验检测机械缩足反射阈值; HE 染色观察食管组织病变; 甲苯胺蓝观察食管组织肥大细胞数量; 透射电子显微镜观察食管黏膜上皮细胞桥粒结构变化; 免疫组化检测食管组织 P 物质 (SP)、降钙素基因相关肽 (CGRP) 表达; RT-qPCR 及 Western blot 法检测食管组织蛋白激酶 A (PKA)、瞬时受体电位香草酸亚型 1 (TRPV1)、SP、CGRP、紧密连接蛋白 (Occludin) 表达。结果 与空白组比较, 模型组大鼠机械缩足反射阈值降低 ($P < 0.05$), 痛觉敏感性升高, 食管组织中肥大细胞数量增加 ($P < 0.05$), SP、CGRP、PKA (p-PKA)、TRPV1 mRNA 和蛋白表达升高 ($P < 0.05$), Occludin mRNA 和蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 组织中细胞桥粒结构减少; 与模型组比较, 降逆通腑方组大鼠机械缩足反射阈值升高 ($P < 0.05$), 痛觉敏感性降低, 食管组织中肥大细胞数量减少 ($P < 0.05$), SP、CGRP、PKA (p-PKA)、TRPV1 mRNA 和蛋白表达降低 ($P < 0.05$), Occludin mRNA 和蛋白表达升高 ($P < 0.05$), 组织中细胞桥粒结构增加, 其中中剂量组综合效果较佳, 与多潘立酮相当。结论 降逆通腑方可有效改善 NERD 内脏高敏感表型, 其机制可能与调控 PKA/TRPV1 信号通路及下游神经肽释放相关。

关键词: 降逆通腑方; 非糜烂性反流病; 内脏敏感性; PKA/TRPV1 信号通路; 神经肽

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2026)01-0073-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2026.01.011

Effects of Jiangni Tongfu Formula on visceral hypersensitivity in non-erosive reflux disease rats based on PKA/TRPV1 signaling pathway

LI Pei-fang¹, YANG Dan^{2#}, LI Ting-quan^{1*}, LU Wen-jing¹, SHEN Ye-fei²

(1. Department of Spleen and Stomach, Affiliated Hospital of Shanxi University of Chinese Medicine, Shanxi 030024, China; 2. Shanxi University of Chinese Medicine, Shanxi 030024, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the effect of Jiangni Tongfu Formula on the visceral hyper-sensitivity in rats with non-erosive reflux disease (NERD). **METHODS** The rats were randomly divided into blank group, model group, domperidone group (0.31 mg/kg) and low, medium and high dose groups of Jiangni Tongfu Formula (6.75, 13.5 and 27 g/kg), with 6 rats in each group. Except for the blank group, the other groups used pylorus semi-ligation combined with gastric fundus ligation to construct NERD models, and administered orally every day after modeling. After the administration, the pH value of rat esophagus was measured by pH meter. The threshold of mechanical foot contraction reflex was detected by pain behavior experiment. HE staining was used to observe esophageal tissue lesions. The number of mast cells in esophageal tissue was observed by toluidine blue. The changes of desmosome structure in esophageal epithelial cells were observed by transmission electron microscope.

收稿日期: 2025-05-14

基金项目: 山西省基础研究计划项目 (青年科学项目) (202203021212026)

作者简介: 李佩芳 (1983—), 女, 硕士, 副主任医师, 从事消化系统疾病基础、临床研究。E-mail: fangfang444@163.com

#共同第一作者: 杨丹 (1999—), 女, 硕士在读, 从事消化系统疾病基础、临床研究。E-mail: 18703508316@139.com

*通信作者: 李廷荃 (1966—), 男, 博士, 主任医师, 从事消化系统疾病基础、临床研究。E-mail: 15003519966@163.com

The expressions of substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in esophageal tissues were detected by immunohistochemistry. RT-qPCR and Western blot were used to detect the expressions of protein kinase A (PKA), transient receptor potential vanillic acid subtype 1 (TRPV1), SP, CGRP and Occludin in esophageal tissues. **RESULTS** Compared with the blank group, the threshold of mechanical foot contraction reflex in the model group of NERD rats decreased ($P < 0.05$), the pain sensitivity increased, the number of mast cells in esophageal tissue increased ($P < 0.05$), the expressions of SP, CGRP, PKA (p-PKA), TRPV1 mRNA and protein increased ($P < 0.05$), and the expressions of Occludin mRNA and protein decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the threshold of mechanical foot-withdrawal reflex in Jiangni Tongfu Formula group increased ($P < 0.05$), the pain sensitivity decreased, the number of mast cells in esophageal tissue decreased ($P < 0.05$), the expressions of SP, CGRP, PKA (p-PKA), TRPV1 mRNA and protein decreased ($P < 0.05$), and the expressions of Occludin mRNA and protein increased ($P < 0.05$). The desmosome structure in the esophageal tissue of rats in the treatment group increased, and the comprehensive effect of the middle dose was better, which was equivalent to domperidone. **CONCLUSION** Jiangni Tongfu Formula can effectively improve visceral hypersensitivity phenotype of NERD, and its mechanism may be related to the regulation of PKA/TRPV1 signaling pathway and the release of neuropeptide downstream.

KEY WORDS: Jiangni Tongfu Formula; non-erosive reflux disease; visceral hypersensitivity; PKA/TRPV1 signaling pathway; neuropeptide

胃食管反流病 (gastroesophageal reflux disease, GERD) 核心临床标志为酸反流与胃灼热^[1-2]，我国发病率达 8.2% ~ 17.3%，以糜烂性食管炎与非糜烂性反流病 (non-erosive reflux disease, NERD) 为主要临床分型^[3]。NERD 患者虽具备典型反流症状，但常规内镜检查未见食管黏膜破损，发病机制可能涉及内脏高敏感性 (visceral hypersensitivity, VH)^[4]。尽管质子泵抑制剂 (proton pump inhibitors, PPI) 为 GERD 一线治疗方案，但约 40% ~ 50% 内镜阴性患者对标准剂量 PPI 应答欠佳^[5]。研究表明，NERD 患者食管浅表感觉神经中瞬时受体电位香草酸亚型 1 (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1) 表达上调，提示黏膜层面感觉调控异常在不同表型胃灼热中的关键作用^[6]，TRPV1 阳性传入神经纤维密度与胃灼热、胸痛症状强度呈正相关，可能是缓解本病的潜在干预靶点^[7]。另外，蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) / 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB) 信号通路参与食管感觉调控^[8-9]，为阐明 NERD 内脏高敏机制提供了新方向。

NERD 属于中医“吞酸”范畴，核心病机为肝郁气滞、胃失和降、浊气上逆^[10]。课题组前期自拟的降逆通腑方在临幊上具有治疗 NERD 效果，该方以旋覆代赭汤、枳术汤及柴平汤为基础加减化裁，方中旋覆花、代赭石为君药，降气消痰止呃；生白术、党参健脾益气，而柴胡、枳实疏肝破气、

消积除痞，共为臣药；姜半夏、黄芩、瓜蒌、海螵蛸为佐药；甘草调和诸药^[11-12]，但该方治疗 NERD 的机制尚不明确。因此，本研究通过建立 NERD 大鼠模型，探讨降逆通腑方调控内脏高敏感的具体分子通路，以期为相关治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠，雄性，体质量 300~350 g，购自成都达硕实验动物有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (川) 2020-030]，饲养于山西中医药大学方剂实验室动物房 [实验动物使用许可号 SYXK (晋) 2020-0006]，遵循 3R 原则。本实验经山西中医药大学医学伦理委员会批准 (批号 2022DW206)。

1.2 试剂与药物 多潘立酮片 (批号 20240616) 购自华东医药博华制药有限公司。苏木素染液 (货号 H9627) 购自西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司；伊红染液、甲苯胺蓝 (货号 YE2080、JT8570) 均购自合肥博美生物科技有限责任公司；二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 试剂盒 (货号 ZL1-9018) 购自北京中杉金桥生物有限公司；降钙素基因相关肽 (calcitonin gene related peptide, CGRP)、P 物质 (substance P, SP) 抗体 (货号 BS-10639R、BS-0065R) 均购自北京博奥森生物技术有限公司；辣根过氧化物酶标记山羊抗兔抗体 (货号 GB22303) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司；总 RNA 提取试剂盒 (货号 19221ES50)

购自翌圣生物科技（上海）股份有限公司；逆转录试剂盒（货号 RR047A）、TB GreenTM Premix Ex TaqTM II 试剂（货号 RR820A）均购自宝日医生物技术（北京）有限公司；磷酸化（phosphorylation, p-）PKA 单克隆兔抗、CGRP 单克隆兔抗（货号 HA721864、HA722991）均购自杭州华安生物技术有限公司；SP 单克隆兔抗（货号 DF7522）购自美国 Affinity 公司；TRPV1 单克隆兔抗（货号 ab305299）购自艾博抗（上海）贸易有限公司；紧密连接蛋白（Occludin）单克隆兔抗（货号 13409-1-AP）购自武汉三鹰生物技术有限公司；β-actin 单克隆兔抗（货号 AC026）购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.3 仪器 BA400Digital 数码三目摄像显微摄像系统（厦门麦克奥迪实业集团有限公司）；JEM-1400FLASH 透射电子显微镜（日本电子株式会社）；QuantStudioTM3 实时荧光定量仪（美国伯腾仪器有限公司）；DYZCZ-24FN 型电泳仪（北京六一生物科技有限公司）；ChemiDoc 化学发光凝胶成像系统（美国伯乐公司）。

1.4 药物 降逆通腑方由旋覆花 15 g、代赭石 20 g、枳实 10 g、生白术 30 g、柴胡 9 g、姜半夏 9 g、党参 10 g、黄芩 6 g、瓜蒌 15 g、甘草 6 g、海螵蛸 20 g 组成，均由山西中医药大学附属医院中药房提供，共 150 g/剂。上述药材加入 10 倍量水浸泡 2 h 后煎煮，沸腾后转小火煎煮约 40 min，滤出药液，药渣再加入 6 倍量水煎煮 30 min，滤出药液，合并 2 次滤液，浓缩至 1.7 g/mL，置于 4 ℃ 冰箱中保存。

2 方法

2.1 模型构建 大鼠适应性喂养结束后，参照文献 [13] 报道行幽门半结扎术联合胃底结扎术构建 NERD 模型。大鼠术前 24 h 禁食不禁水，腹腔注射 1% 戊巴比妥钠（50 mg/kg）麻醉后取仰卧位，酒精消毒后沿腹中线打开腹腔，找到食管与胃的连接处，剪断肝胃韧带及胃周围筋膜，将胃全部提出，充分暴露胃及幽门，用 4-0 尼龙线将幽门半结扎，结扎胃底部和胃左动脉，结束后关腹。术后

1 周，在模型基础上加入束缚试验、禁食、禁水等心理应激手段，连续干预 2 周，3 周后大鼠自由饮用 200 g/L 蜂蜜水，交替灌服 56 度白酒（1 mL/100 g）和油脂（2 g/200 g）各 5 次，每天干预 1 次，共 10 d。另取健康大鼠作为空白组，只进行开腹处理，不造模，正常进食饮水。其间取食

管胃结合处液体，测得 pH 在 6.0~7.0 之间，根据行动减少、精神萎靡，以及胃黏膜组织观察到食管黏膜炎性细胞浸润、基底层增生等情况，判定造模成功。

2.2 分组与给药 将 24 只造模成功的大鼠随机分为模型组、多潘立酮组（0.31 mg/kg）和降逆通腑方低、中、高剂量组（6.75、13.5、27 g/kg），每组 6 只，多潘立酮组和降逆通腑方各剂量组灌胃给予相应剂量药物，模型组和空白组灌胃给予生理盐水，每天 1 次，持续 4 周。给药结束后，所有大鼠腹腔注射 50 mg/kg 1% 戊巴比妥钠麻醉处死，采用 pH 仪测定食管 pH 值，收集食管组织。

2.3 机械缩足反射阈值（MWT）测定 造模后当天，通过痛觉行为学测定来反映内脏敏感性变化。采用 von Frey 测试，将大鼠先放入悬空的铁丝网笼内适应 30 min，von Frey 纤维垂直触压右后肢足底中部，并逐渐增加刺激力度直至出现缩足反射，即为阳性，每只重复测量 3 次，每次至少间隔 5 min，记录引起缩足反射的最小刺激力，即 MWT。

2.4 食管组织病理学观察 将大鼠食管组织置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h 以上，脱水后制成石蜡切片，脱蜡后分别进行苏木素、伊红染色，观察病变情况，再进行甲苯胺蓝染色液染色，观察肥大细胞数量。

2.5 透射电镜观察食管组织桥粒结构 大鼠食管组织加入 2.5% 戊二醛一次固定，1% 四氧化锇二次固定，充分脱水后环氧树脂包埋，制成 60~90 nm 超薄切片，室温下先用醋酸铀染色 10~15 min，再用柠檬酸铅染色 1~2 min，透射电子显微镜观察黏膜上皮细胞间桥粒连接情况。

2.6 免疫组织化学检测食管组织 SP、CGRP 蛋白表达 将大鼠食管组织石蜡切片进行脱蜡、抗原修复后阻断内源性过氧化物酶，加入牛血清封闭，加一抗 SP（1:200）、CGRP（1:50），4 ℃ 孵育过夜，再加二抗（1:100），37 ℃ 孵育 30 min，DAB 显色，苏木素复染细胞核，中性树胶封片，在显微镜下拍照，采用 Indica labs 数据图像分析系统分析蛋白阳性面积。

2.7 RT-qPCR 法检测食管组织 CGRP、Occludin、PKA、SP、TRPV1 mRNA 表达 大鼠食管组采用试剂盒提取总 RNA 并逆转录成 cDNA，将 cDNA、目的基因引物和 PCR 反应体系混合，置于 PCR 仪中反应，PCR 扩增反应条件为 95 ℃ 预变性 30 s，95 ℃ 变性 5 s，55 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延展 30 s，共

45个循环。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并提供,序列见表1。

表1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'→3')
CGRP	正向 GTGAAGAAGAAGCTGCCCTACTGG 反向 CCTCAGCCCTCCTGTCCTCCCTC
Occludin	正向 CAACGGCAAAGTGAATGGCAAGAG 反向 TCATCCACGGACAAGTCAGAGC
PKA	正向 TTGGACAAGCAGAAGGTGGTGAAG 反向 CCAGGAACGGGAAGTTGACAGC
SP	正向 ACTGTTGTCGCTGGTATCAACTGC 反向 GACACCGTCTCTCCGTCTCTG
TRPV1	正向 CAGCGAGTTCAAAGACCCAGAGAC 反向 GGAGCAGAGCGATGGTGTCATT
β-actin	正向 GGGAAATCGTGGGTGACATT 反向 GCGGCAGTGGCCATCTC

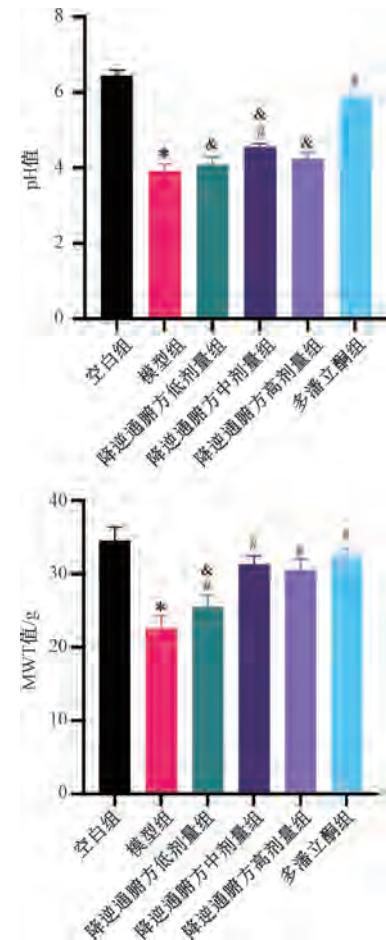
2.8 Western blot 法检测食管组织 p-PKA、TRPV1、Occludin、CGRP、SP 蛋白表达 大鼠食管组织研磨制成组织匀浆液,加入含磷酸酶抑制剂的组织裂解液,冰上裂解 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液,即为总蛋白,BCA 试剂盒进行定量,加入上样缓冲液后 95 ℃金属浴加热 10 min 进行变性,凝胶电泳分离蛋白,电转移至聚偏二氟乙烯膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,加一抗 p-PKA (1 : 1 000)、TRPV1 (1 : 1 000)、Occludin (1 : 2 000)、CGRP (1 : 2 000)、SP (1 : 2 000)、β-actin (1 : 5 000), 4 ℃孵育过夜,清洗后加二抗 (1 : 8 000), 室温孵育 2 h, 清洗后滴加发光液,避光处理 1 min, 在凝胶成像仪上曝光、拍照,分析目的蛋白灰度值。

2.9 统计学分析 通过 SPSS 20.0 软件进行处理,所有数据均符合正态分布,以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,方差齐则采用 LSD-t 检验,方差不齐则采用 Tamhane's T2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 降逆通腑方对 NERD 大鼠食管 pH 值和痛觉敏感性异常的影响 与空白组比较,模型组大鼠食管 pH 值和 MWT 值降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,降逆通腑方中剂量组和多潘立酮组大鼠食管 pH 值升高 ($P < 0.05$),降逆通腑方各剂量组和多潘立酮组 MWT 值升高 ($P < 0.05$);与多潘立酮组比较,降逆通腑方各剂量组大鼠食管 pH 值降低 ($P < 0.05$),降逆通腑方低剂量组大鼠 MWT 值降低 ($P < 0.05$),见图 1。结果表明,NERD 大鼠呈

现胃内容物反流与痛觉敏感性升高,符合相关特征;中剂量降逆通腑方和多潘立酮能缓解大鼠胃内容物反流现象,但前者效果不如后者;中、高剂量降逆通腑方和多潘立酮均能降低大鼠敏感性,三者效果基本一致。



注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$;与多潘立酮组比较,& $P < 0.05$ 。

图 1 各组大鼠食管 pH 值和 MWT 值 ($\bar{x} \pm s$, n=6)Fig. 1 Esophageal pH value and MWT value of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, n=6)

3.2 降逆通腑方对 NERD 大鼠食管组织病理损伤的影响 空白组大鼠食管组织管壁 4 层结构清晰完整,黏膜层表面为复层扁平上皮;模型组和降逆通腑方各剂量组大鼠食管组织角化过度,角质层增厚,组织黏膜层增厚,可见棘层细胞数量增多,排列紊乱,未观察到食管黏膜糜烂或损伤,符合 NERD 特征,其中模型组和降逆通腑方低剂量组黏膜层上皮增厚,表面不规则,局部上皮呈钉突状,食管组织黏膜固有层内可见少量炎性细胞浸润,主要为中性粒细胞,并伴有纤维组织增生,见核呈长椭圆形的成纤维细胞数量增多。与空白组比较,模

型组大鼠食管组织内肥大细胞数量增加 ($P < 0.05$)；与模型组比较，降逆通腑方各剂量组大鼠食管组织内肥大细胞数量减少 ($P < 0.05$)；与多潘立酮组比较，降逆通腑方低、中剂量组大鼠食管组织内肥大细胞数量增加 ($P < 0.05$)。见图 2~3。

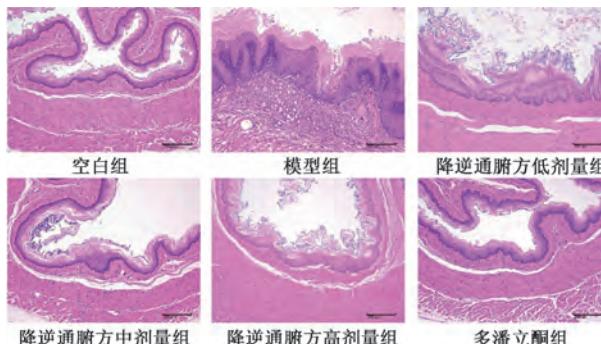
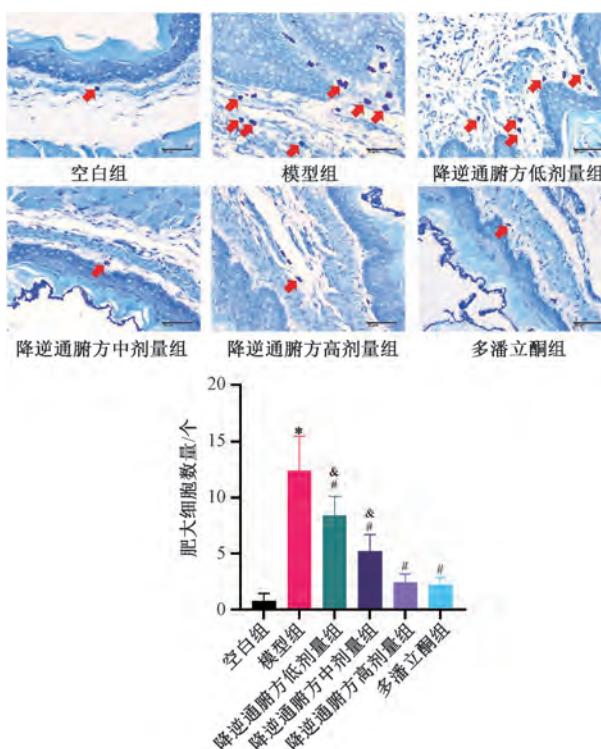


图 2 各组大鼠食管组织 HE 染色 ($\times 400$)

Fig. 2 HE staining of esophageal tissue in rats in each group ($\times 400$)



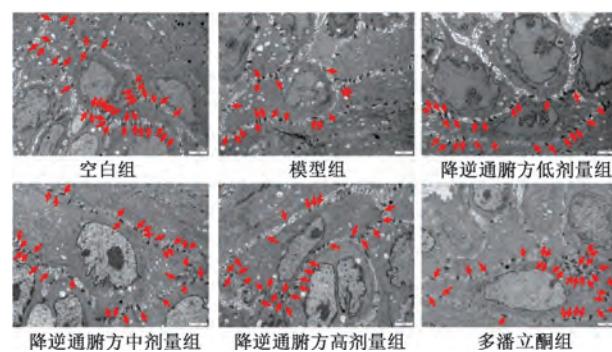
注：红色箭头为肥大细胞。与空白组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ；与多潘立酮组比较，* $P < 0.05$ 。

图 3 各组大鼠食管组织中肥大细胞数量变化 (甲苯胺蓝染色, $\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Changes in mast cells in esophageal tissue of rats in each group (toluidine blue staining, $\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.3 降逆通腑方对 NERD 大鼠食管组织细胞桥粒结构的影响 NERD 大鼠食管组织中细胞桥粒结构

减少，而降逆通腑方各剂量组和多潘立酮组大鼠食管组织中细胞桥粒结构增加，见图 4。



注：红色箭头为桥粒结构。

图 4 各组大鼠食管组织中细胞桥粒结构数量变化 (透射电镜, $\times 25 000$)

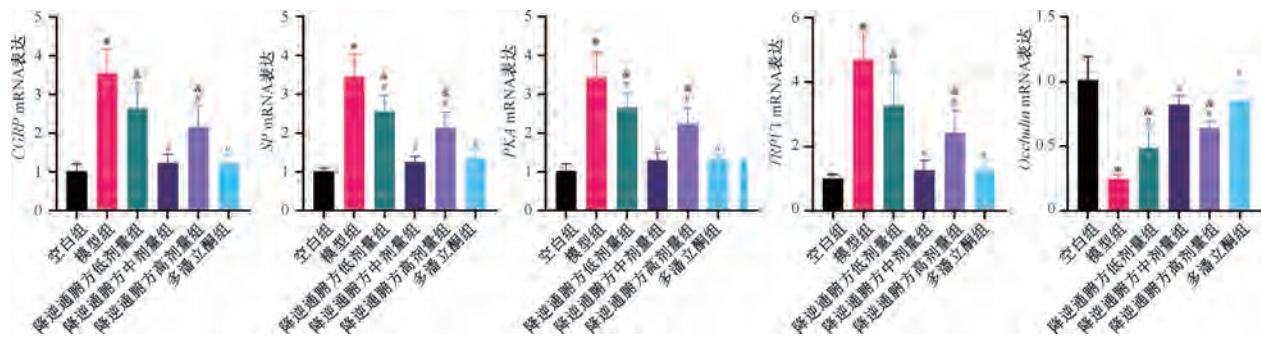
Fig. 4 Quantitative changes in desmosome structure in esophageal tissue of rats in each group (transmission electron microscope, $\times 25 000$)

3.4 降逆通腑方对 NERD 大鼠食管组织 *CGRP*、*SP*、*PKA*、*TRPV1*、*Occludin* mRNA 表达的影响 与空白组比较，模型组大鼠食管组织 *CGRP*、*SP*、*PKA*、*TRPV1* mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)，*Occludin* mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)；与模型组比较，降逆通腑方各剂量组和多潘立酮组大鼠食管组织 *CGRP*、*SP*、*PKA*、*TRPV1* mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)，*Occludin* mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)；与多潘立酮组比较，降逆通腑方低、高剂量组大鼠食管组织 *CGRP*、*SP*、*PKA*、*TRPV1* mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)，*Occludin* mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)，见图 5。

3.5 降逆通腑方对 NERD 大鼠食管组织 *CGRP*、*SP*、*PKA*、*TRPV1* 和 *Occludin* 蛋白表达的影响 与空白组比较，模型组大鼠食管组织 *CGRP*、*SP*、*PKA*、*TRPV1* 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)，*Occludin* 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)；与模型组比较，降逆通腑方各剂量组和多潘立酮组大鼠食管组织 *CGRP*、*SP*、*PKA*、*TRPV1* 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)，*Occludin* 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)；与多潘立酮组比较，降逆通腑方低、高剂量组大鼠食管组织 *CGRP*、*SP*、*PKA*、*TRPV1* 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)，*Occludin* 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)，见图 6~7。

4 讨论

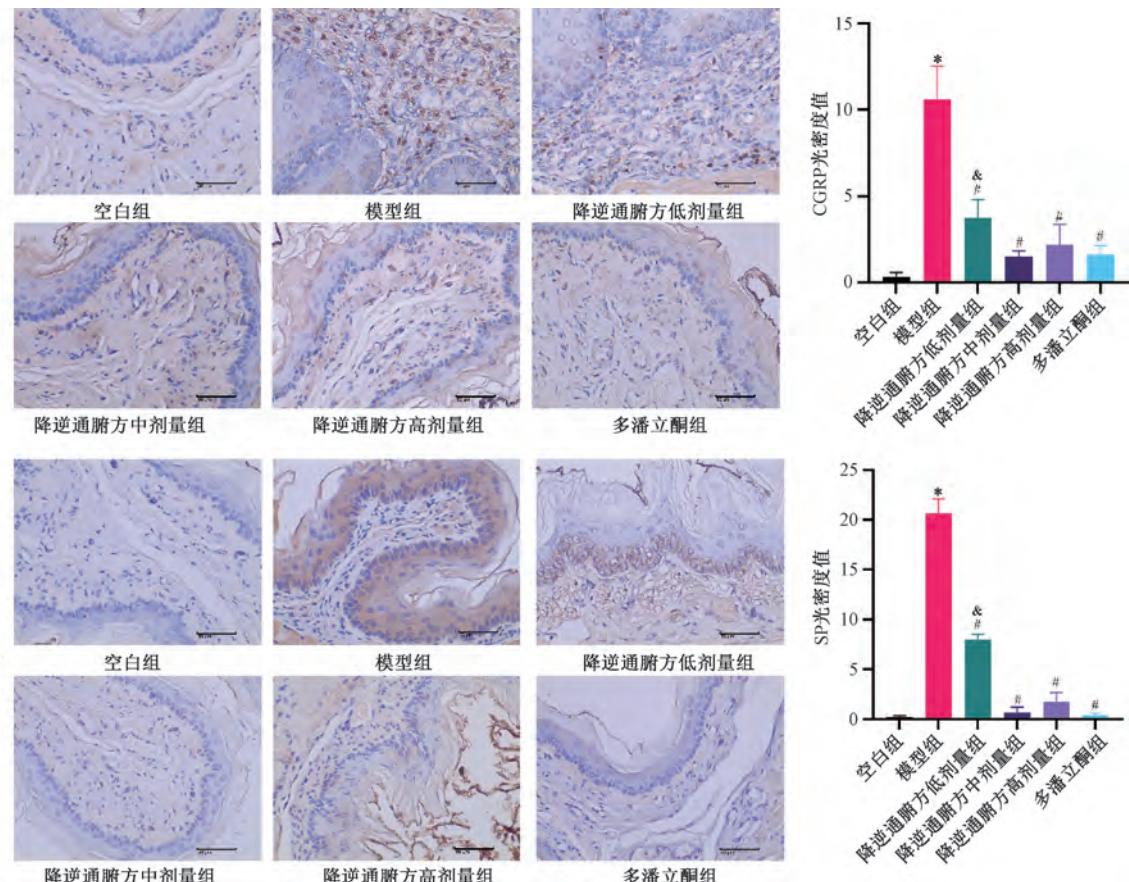
食管伤害性感知的核心机制涉及初级传入伤害性纤维的激活，健康个体食管黏膜内存在完整的伤害性神经纤维网络，食管远端黏膜神经主要定位于上皮基底层，而近端神经则密集分布于浅



注：与空白组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ；与多潘立酮组比较，\\$ $P < 0.05$ 。

图 5 各组大鼠食管组织 *CGRP*、*SP*、*PKA*、*TRPV1* 和 *Occludin* mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Fig. 5 *CGRP*, *SP*, *PKA*, *TRPV1* and *Occludin* mRNA expressions in esophageal tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, n=3)



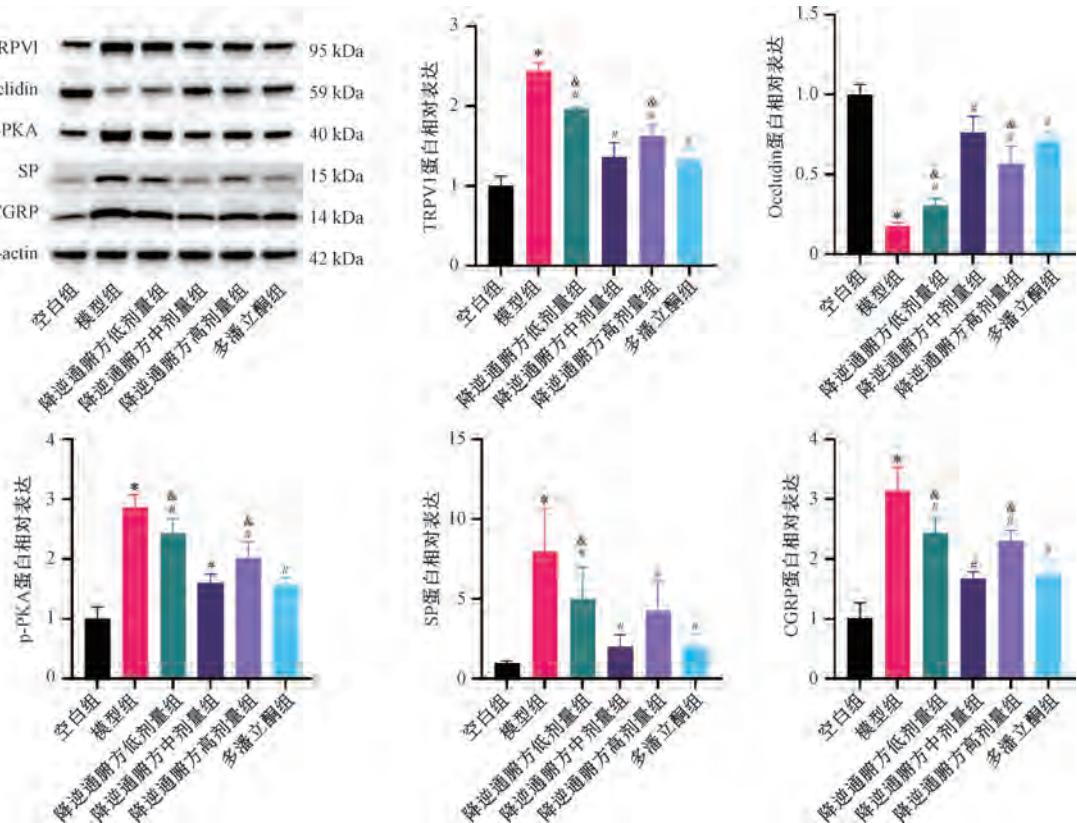
注：与空白组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ；与多潘立酮组比较，\\$ $P < 0.05$ 。

图 6 各组大鼠食管组织 CGRP 和 SP 蛋白表达 (免疫组织化学, $\times 400$, $\bar{x} \pm s$, n=3)

Fig. 6 *CGRP* and *SP* protein expressions in esophageal tissue of rats in each group (immunohistochemistry, $\times 400$, $\bar{x} \pm s$, n=3)

表上皮层，紧邻管腔界面^[14]。研究表明，急性应激状态可通过上调食管黏膜通透性，促进胃酸渗透至深层伤害性感受器，其机制可能与肥大细胞脱颗粒引发的紧密连接重构或桥粒动态分布改变相关^[15]，同时食管复层鳞状上皮的角质细胞桥粒动态平衡紊乱可能与内脏高敏感及屏障功能障碍密切相关^[7]。肥大细胞通过神经-免疫轴与感觉神

经纤维形成双向交互作用，敏化神经末梢释放 SP 等神经肽释放神经营养因子，进而通过肥大细胞-神经环路放大伤害性信号传导^[16-17]。NERD 患者虽无内镜下可见的黏膜破损，但反复酸/胆汁反流可诱导 Occludin 表达异常，通过破坏紧密连接复合体稳定性导致黏膜通透性失调^[18]。本实验结果显示，NERD 模型组大鼠呈现 MWT 值降低、



注：与空白组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，** $P < 0.05$ ；与多潘立酮组比较，△ $P < 0.05$ 。

图7 各组大鼠食管组织 CGRP、SP、PKA、TRPV1 和 Occludin 蛋白表达 (Western blot, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 CGRP, SP, PKA, TRPV1 and Occludin protein expressions in esophageal tissue of rats in each group (Western blot, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

食管上皮桥粒结构密度减少、Occludin蛋白异常高表达等特征性改变，同时伴随肥大细胞浸润和SP升高，成功模拟了内脏高敏感表型；经降逆通腑方干预后，上述异常情况得到改善（中剂量组作用与多潘立酮组相当），提示该方可能通过修复上皮机械连接结构与调节神经免疫来交互发挥治疗作用。

TRPV1作为非选择性阳离子通道，其活性受炎症微环境严格调控，如神经元中TRPV1通道上调可介导痛觉敏化^[19]，常继发于炎症反应或促炎介质（如SP）诱导的组织损伤过程，分子机制涉及PKA对TRPV1亚基的特异性磷酸化修饰^[20]。临床研究证实，TRPV1上调与功能性消化不良等疾病的内脏高敏感表型相关，其激活可触发SP、CGRP等神经肽释放，诱导神经源性炎症级联反应，表现为血管扩张、血浆外渗、组织水肿等典型炎性征象^[21]，例如介导释放SP、CGRP及神经激肽，参与疼痛信号转导^[22]。Zhang等^[23]证实，TRPV1在食管下段的表达密度高于上段，与临床反流感知区域分布高度吻合。Ustaoglu等^[6]发现，

NERD患者浅表感觉神经TRPV1表达量高于BE、ERD患者，表明PKA/TRPV1信号通路可能是诱发NERD的关键通路。本研究发现，NERD模型组大鼠食管组织PKA/TRPV1信号通路激活，表现为PKA、TRPV1 mRNA、蛋白表达上调，伴随SP、CGRP水平升高。

本研究共设置3个剂量降逆通腑方，发现中剂量（成人临床用量等效剂量）药效最强，方中黄芩、代赭石均属苦寒药；海螵蛸可中和胃酸并抑制其分泌，但过高剂量反而会加重胃内容物潴留，诱发胃酸反流，损伤脾胃阳气，加剧NERD大鼠脾胃虚寒状态。因此，在临幊上使用降逆通腑方时需根据患者不同时期的症状对剂量进行加减处理，在确保药效的同时减少组织损伤。

综上所述，降逆通腑方可有效改善NERD大鼠内脏高敏感表型，其机制可能与调控PKA/TRPV1信号通路及下游神经肽释放相关。但本研究存在模型局限性等问题，后续将开展多组学整合分析以完善机制阐释，为中医药治疗GERD提供高级别循证依据。

参考文献:

- [1] Tian Y, Zhang W, Zhang T, et al. Analysis of the correlation between dynamic characteristics and symptoms of gastroesophageal reflux disease[J]. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*, 2024, 34(3): 268-274.
- [2] Vakil N, van Zanten S V, Kahrilas P, et al. The montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus[J]. *Am J Gastroenterol*, 2006, 101(8): 1900-1920.
- [3] Wang K, Zhang L, He Z H, et al. A population-based survey of gastroesophageal reflux disease in a region with high prevalence of esophageal cancer in China[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2019, 132(13): 1516-1523.
- [4] Xu C, Niu X. Progress on the mechanism of visceral hypersensitivity in nonerosive reflux disease[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2022, 2022: 4785077.
- [5] Wu Y, Liao S, Qu T, et al. Is reflux hypersensitivity truly a functional gastrointestinal disorder? A retrospective cross-sectional study[J]. *PLoS One*, 2025, 20(1): e0316226.
- [6] Ustaoglu A, Sawada A, Lee C, et al. Heartburn sensation in nonerosive reflux disease: pattern of superficial sensory nerves expressing TRPV1 and epithelial cells expressing ASIC3 receptors[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2021, 320(5): G804-G815.
- [7] Ying L N, Sun Y, Cui L Y, et al. Recent advances in the knowledge of the mechanism of reflux hypersensitivity[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2024, 59(5): 518-523.
- [8] Wang Y, Li G W, Zhu S L, et al. NMDAR2B/PKA/CREB signaling pathway contributes to esophageal neuropathic pain in gastroesophageal reflux disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2025, 31(11): 98974.
- [9] Zhao Y, Ma T, Zou D. Identification of unique transcriptomic signatures and hub genes through RNA sequencing and integrated WGCNA and PPI network analysis in nonerosive reflux disease[J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14(1): 6143-6156.
- [10] 刘佳丽, 寇富舜, 谢春娥, 等. 和胃降逆方对卵清蛋白联合酸灌注诱导非糜烂性反流病大鼠食管黏膜中 PAR2、SP、CGRP 蛋白表达的影响[J]. 环球中医药, 2020, 13(2): 187-193.
- [11] 张丽娜, 郭洪波, 李佩芳. 降逆通腑方对内脏高敏感脾胃湿热型非糜烂性反流病胃肠激素的影响及临床疗效[J]. 中华中医药学刊, 2023, 42(3): 194-197.
- [12] 李佩芳, 李廷荃, 杨丽芳, 等. 降逆通腑方治疗非糜烂性反流病疗效评价[J]. 云南中医学院学报, 2021, 44(3): 33-38.
- [13] Wei J, Zhang J, Jiang Y, et al. Elevated pro-inflammatory cytokine levels in acute reflux esophagitis are reduced by 1, 25 dihydroxy vitamin D3[J]. *In Vivo*, 2023, 37(1): 79-87.
- [14] Woodland P, Shen Ooi J L, Grassi F, et al. Superficial esophageal mucosal afferent nerves may contribute to reflux hypersensitivity in nonerosive reflux disease[J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(5): 1230-1239.
- [15] Voulgaris T, Lekakis V, Vlachogiannakos J, et al. Efficacy of citalopram or amitriptyline versus no treatment in patients with functional chest pain[J]. *Ann Gastroenterol*, 2023, 36(1): 6-11.
- [16] Bhuiyan P, Wang Y W, Sha H H, et al. Neuroimmune connections between corticotropin-releasing hormone and mast cells: novel strategies for the treatment of neurodegenerative diseases[J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(11): 2184-2197.
- [17] 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.
- [18] Ergun P, Kipca S, Gorgulu V, et al. Molecular and functional recovery of esophageal barrier integrity after laparoscopic anti-reflux surgery[J]. *Dig Dis Sci*, 2025, 70(8): 2665-2673.
- [19] Yu M, Chang C, Undem B J, et al. Capsaicin-sensitive vagal afferent nerve-mediated interoceptive signals in the esophagus[J]. *Molecules*, 2021, 26(13): 3929.
- [20] Yoshihara M, Tsujimura T, Suzuki T, et al. Sustained laryngeal transient receptor potential vanilloid 1 activation inhibits mechanically induced swallowing in anesthetized rats[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2020, 319(3): G412-G419.
- [21] Li H, Buisman-Pijlman F T A, Nunez-Salces M, et al. Chronic stress induces hypersensitivity of murine gastric vagal afferents[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2019, 31(12): e13669.
- [22] 魏周园, 郑雨, 江民健, 等. 电针对背根神经节持续受压模型大鼠机械痛阈及 TRPV1、SP、CGRP 表达的影响[J]. 中国疼痛医学杂志, 2025, 31(4): 250-258.
- [23] Zhang Z, Wu X, Zhang L, et al. Menthol relieves acid reflux inflammation by regulating TRPV1 in esophageal epithelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 17: S0006-291X(20) 30318-1.