

· 论 著 ·

TRPV1 和 NaV1.8 在食管高敏感中的作用和机制研究*

吴白馨^{1,2#} 次仁玉珍^{1,2} 彭 帅^{1,2} 吴祖楠^{1,2} 张毓玲³ 余晓云³ 沈 磊^{1&}
武汉大学人民医院消化内科¹(430060) 消化系统疾病湖北省重点实验室²
华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科³

背景: 食管高敏感是胃食管反流病(GERD)患者烧心等症状产生的重要原因。瞬时受体电位香草酸亚型 1 (TRPV1)和电压门控钠离子通道 1.8(NaV1.8)可能在食管高敏感的调控中发挥重要作用。**目的:** 检测 TRPV1、NaV1.8 在 GERD 动物模型食管和迷走神经感觉神经元中的表达,探究其在食管高敏感中的作用。**方法:** 12 只雄性豚鼠随机分为对照组和 GERD 组,后者通过饮用盐酸胃蛋白酶溶液建立 GERD 模型。通过观察动物体质量变化、食管炎症组织学评分和炎症细胞因子表达验证造模成功与否。通过分析心率变异性(HRV)明确动物是否处于内脏高敏感状态。以免疫荧光法、qRT-PCR 和蛋白质印迹法检测食管、迷走神经结状神经节和颈静脉神经节中的 TRPV1、NaV1.8 表达、分布和共表达情况。**结果:** GERD 组食管炎症组织学评分显著高于对照组(0.85±0.43 对 0.22±0.45),促炎细胞因子表达增高,抗炎细胞因子表达降低,体质量增长缓慢(P 均<0.05)。造模前两组 HRV 指标低频/高频(LF/HF)比值无明显差异($P>0.05$),造模后 GERD 组 LF/HF 比值显著增高($P<0.05$)。GERD 组食管黏膜上皮和颈静脉神经节 TRPV1、NaV1.8 表达和共表达均显著上调(P 均<0.05),结状神经节中两者表达无明显变化(P 均>0.05)。**结论:** 在食管酸暴露情况下,食管黏膜上皮 TRPV1、NaV1.8 表达增高,迷走神经颈静脉神经节中两者表达亦显著上调,促进迷走神经通路伤害性信号的传递,最终导致食管高敏感发生。

关键词 胃食管反流病; 食管高敏感; TRPV1; NaV1.8; 迷走神经; 结状神经节; 颈静脉神经节

Role and Mechanism of TRPV1 and NaV1.8 in Esophageal Hypersensitivity WU Baixin^{1,2}, Cirenuyuzhen^{1,2}, PENG Shuai^{1,2}, WU Zunan^{1,2}, ZHANG Yuling³, YU Xiaoyun³, SHEN Lei¹. ¹Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan (430060); ²Hubei Key Laboratory of Digestive Diseases, Wuhan; ³Department of Gastroenterology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan

Correspondence to: SHEN Lei, Email: szggyx2017@163.com

Background: Hypersensitivity of esophagus is an important cause of heartburn and other symptoms in patients with gastroesophageal reflux disease (GERD). It has been revealed that transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) and voltage-gated sodium channel NaV1.8 might contribute to the regulation of esophageal hypersensitivity. **Aims:** To explore the expression levels of TRPV1 and NaV1.8 in esophagus and vagal sensory neurons in GERD animal model and their roles in mediating esophageal hypersensitivity. **Methods:** Twelve male guinea pigs were randomly allocated into control group and GERD group. Model of GERD was established by drinking hydrochloric-pepsinogen acid water and verified by body weight monitoring, esophageal inflammatory histological scoring and measurements of pro- and anti-inflammatory cytokines. Visceral hypersensitivity was determined by heart rate variability (HRV) analysis. Expressions, distribution, and co-expression of TRPV1 and NaV1.8 in esophagus and vagal nodose/jugular ganglia were quantified by immunofluorescence, qRT-PCR and Western blotting. **Results:** Compared with the control group, score of esophageal inflammatory histology in GERD group was increased (0.85±0.43 vs. 0.22±0.45), accompanied by elevated proinflammatory cytokine expressions and reduced antiinflammatory cytokine expression (all $P<0.05$). The weight gain was also slower in GERD group than in control

group ($P<0.05$). As an indicator of HRV analysis, the low frequency to high frequency (LF/HF) ratio had no significant difference between GERD group and control group before model construction ($P>0.05$), but increased significantly in GERD group after modeling ($P<0.05$). In GERD group, expressions and co-expression of TRPV1 and NaV1.8 were up-regulated in esophageal mucosal epithelium and jugular ganglion (all $P<0.05$), but not changed in nodose ganglion (all $P>0.05$). **Conclusions:** In the acid-exposed esophagus, expressions of TRPV1 and NaV1.8 were up-regulated in esophageal mucosal epithelium and vagal jugular ganglion, thus promoting the nociceptive transmission in vagus nerve pathway, and ultimately resulting in esophageal hypersensitivity.

Key words Gastroesophageal Reflux Disease; Esophageal Hypersensitivity; TRPV1; NaV1.8; Vagus Nerve; Nodose Ganglion; Jugular Ganglion

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)是常见的消化系统疾病,反酸和烧心为其典型症状。既往研究发现食管高敏感是GERD患者产生烧心等症状的重要原因,食管高敏感导致食管对酸的感觉阈值降低,致使患者在食管酸暴露时出现烧心症状^[1]。

瞬时受体电位香草酸亚型1(transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)是瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP)超家族成员之一,是一种非选择性阳离子通道蛋白,广泛表达于感觉神经末梢和神经元胞体^[2],在炎症和疼痛反应中起重要作用。临床研究^[3]证实,反流性食管炎患者食管黏膜TRPV1阳性感觉神经纤维分布明显增多。既往体外实验研究^[4]表明,食管酸灌注可使TRPV1表达上调并通过激活TRPV1增加迷走神经元兴奋性,TRPV1表达上调和功能活性增加可能是食管高敏感的重要发生机制。

跨膜通道电压门控钠离子通道1.8(voltage-gated sodium channel 1.8, NaV1.8)由一个 α 亚单位和一个或多个 β 亚单位组成,主要表达于外周感觉神经元,与炎性、神经性疼痛和内脏高敏感密切相关^[5-6],90%以上的伤害性感受器中存在NaV1.8表达^[7]。既往研究^[8]发现,由炎症或神经损伤诱导的CC趋化因子配体2(CCL2)表达和释放可上调脊髓背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)伤害性感觉神经元中的TRPV1、NaV1.8表达及其功能,诱发痛觉过敏。已有一些研究探索了TRPV1在GERD食管感觉中的作用,对NaV1.8的研究则相对少见。本研究利用GERD豚鼠模型,分析食管酸暴露状态下食管和迷走神经结状神经节、颈静脉神经节中TRPV1、NaV1.8的表达、分布和共表达及其在食管高敏感中的作用,以期对食管高敏感的治疗提供新思路。

材料与方法

一、实验动物和主要试剂

1. 实验动物:雄性SPF级豚鼠12只,3~4周龄,体质量250~350 g,由武汉大学人民医院实验动物中心提供。实验动物的使用符合《武汉大学人民医院动物伦理委员会准则》,伦理批准号:20220803A。动物分笼饲养于室温22~25℃的专业豚鼠室,每笼3只,自由饮水、进食。造模前予无菌水和标准饲料饲养7 d以适应环境。

2. 主要试剂:TRIzol RNA提取试剂(Invitrogen, Thermo Fisher Scientific);Evo M-MLV一步法RT-qPCR试剂盒、SYBR Green Pro Taq HS预混型qPCR试剂盒(艾科瑞生物);一抗TRPV1兔多克隆抗体(Abcam Limited.),NaV1.8小鼠单克隆抗体(Merck KGaA);三色多重免疫荧光试剂盒(兔鼠通用二抗;茹创生物);含DAPI抗荧光淬灭封片剂(翌圣生物科技);RIPA强效裂解液、PMSF(碧云天生物);HRP标记山羊抗兔、山羊抗小鼠抗体、重组GAPDH抗兔抗体(赛维尔生物)。

二、方法

1. 动物分组和GERD模型建立:参照Li等^[9]的造模方法进行改良制备GERD模型。12只SPF级豚鼠随机分为正常对照组和GERD组,每组6只。适应性饲养7 d后,正常对照组每笼每天予500 mL无菌水,GERD组每笼每天予500 mL盐酸胃蛋白酶溶液(含胃蛋白酶0.01 mg/mL, pH=3),连续饮用28 d,每天记录实验动物体质量。

2. 心率变异性(heart rate variability, HRV)测量:豚鼠适应性饲养7 d后,予戊巴比妥30 mg/kg腹腔麻醉,连接PowerLab生理记录仪纪录15 min稳定

心电图,使用配套软件 LabChart 8.1 中的 HRV 分析功能计算 5 min 稳定心电图纪录图中的功率谱,分析低频 (low frequency, LF)、高频 (high frequency, HF) 和 LF/HF 比值。造模 28 d 后重复上述步骤。

3. 食管炎症组织学评分:造模 28 d 后处死两组实验动物,于食管下段取材,制作 HE 染色切片,行食管炎症组织学评分^[9-11]。

4. qRT-PCR:取豚鼠食管下段组织、迷走神经结状神经节和颈静脉神经节,以 qRT-PCR 法检测 TRPV1、NaV1.8 表达,并通过检测食管组织促炎和抗炎细胞因子表达明确造模成功与否^[10]。参照相应试剂盒说明书提取总 RNA,逆转录合成 cDNA,以之为模板行 PCR 扩增,2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因 mRNA 相对表达量。PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1)。

表 1 qRT-PCR 引物序列

目的基因	引物序列 (5'-3')
TRPV1	F 5'-AAT GTG GGC ATC ATC AAC GAG-3' R 5'-ACC AGG GCA AAG TTC TTC CAG T-3'
NaV1.8	F 5'- CTC TTC CGA GTC ATC CGC CT-3' R 5'- GCC CGA TGT TGA AGA GAG CA-3'
IL-1β	F 5'- CCC TTG CAA CCC TTC ATC TT -3' R 5'- ATG CTG TAT TGC GAG GAG TG-3'
IL-6	F 5'- CTG AGC GGA ACT CCA GAT GC-3' R 5'- GGC GCT GAA GGT CGA TTT CA-3'
IL-10	F 5'- CGA CGC TGT CAT CGA TTT CT-3' R 5'- CGC CTT TCT CTT GGA GCT TAT-3'
TNF-α	F 5'-ATC TAC CTG GGA GGC GTC TT-3' R 5'- GAG TGG CAC AAG GAA CTG GT-3'
GAPDH	F 5'-TCA AGA AGG TGG TGA AGC AGG-3' R 5'- CTG TTG CTG TAG CCG AAC TCA T-3'

注:TRPV1 为瞬时受体电位香草酸亚型 1;NaV1.8 为电压门控钠离子通道 1.8;IL 为白细胞介素;TNF-α 为肿瘤坏死因子-α;GAPDH 为磷酸甘油醛脱氢酶(内参);F 为正向引物;R 为反向引物

5. 双重免疫荧光染色:研究采用酪胺信号放大 (tyramide signal amplification, TSA) 技术行双重免疫荧光染色。豚鼠食管下段、迷走神经结状神经节和颈静脉神经节组织石蜡切片二甲苯脱蜡,梯度乙醇去除二甲苯;柠檬酸缓冲液 (pH=6.0) 微波加热修复抗原,3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶,5% BSA 室温封闭 30 min;滴加 TRPV1 一抗 (1:800),4 °C 孵育过夜;滴加免疫荧光试剂盒中的高敏多聚 HRP 标记山羊抗兔/小鼠二抗,室温孵育 30 min;加入红色酪

胺荧光染料 TRY-570 反应 15 min, PBS 冲洗后重复上述抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、封闭步骤;滴加 NaV1.8 一抗 (1:800),4 °C 孵育过夜;加入绿色酪胺荧光染料 TRY-520 反应 15 min,以含 DAPI 抗荧光淬灭封片剂进行细胞核染色和封片。OLYMPUS BX53 显微镜观察 TRPV1、NaV1.8 表达和分布。随机选取 3 张比例尺=50 μm 的免疫荧光染色图片,应用 ImageJ 软件根据亮度计数染色细胞,分析 TRPV1 或 NaV1.8 阳性细胞数占食管黏膜上皮细胞总数或神经节细胞总数(通过 HE 染色和 DAPI 染色计数确定)的比例,结果取均值。

6. 蛋白质印迹法:取豚鼠食管下段、迷走神经结状神经节和颈静脉神经节组织,每 30 mg 组织加入 300 μL 强效 RIPA 裂解液,每 100 μL 强效 RIPA 加入 1 μL PMSF,置于冰上裂解 30 min;离心 20 min,取上清液,按 100 μL 样品加入 25 μL 5×上样缓冲液,混合物 100 °C 煮 10 min,冷却后上样。配置 7.5% SDS-PAGE 胶,恒压 80 mV 电泳 20 min,恒压 150 mV 电泳 50 min,恒流 300 mA 电转 3 h,5% 脱脂奶粉封闭 2 h;分别滴加 TRPV1 兔多克隆抗体 (1:1 000)、NaV1.8 小鼠单克隆抗体 (1:800)、GAPDH 抗体 (1:1 500),4 °C 过夜;加入 HRP 标记山羊抗兔 IgG (1:3 000)、山羊抗小鼠 IgG (1:3 000),室温孵育 1 h;TBST 洗涤 30 min,增强化学发光法显影、定影,ImageJ 软件分析目的蛋白相对表达量。

三、统计学分析

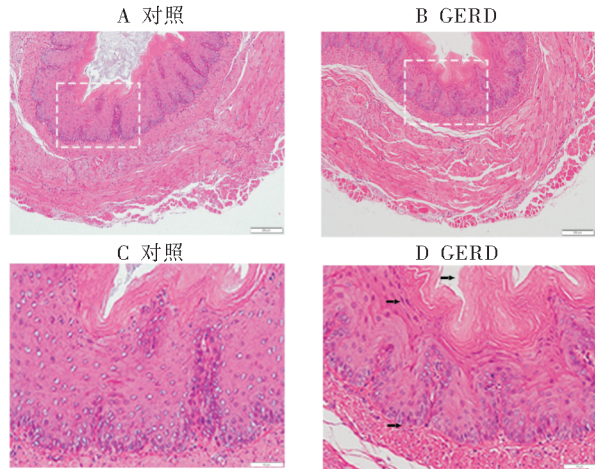
应用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 描述,两组间正态分布数据的比较采用独立样本 *t* 检验,非正态分布数据的比较采用 Mann-Whitney *U* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、GERD 模型建立

造模过程中无实验动物死亡,实验数据均纳入统计分析。食管炎症组织学评分显示,GERD 组豚鼠食管组织综合损伤评分为 0.85±0.43,而正常对照组仅为 0.22±0.45,差异有统计学意义 (*P*=0.005 8;图 1、表 2);GERD 组食管组织促炎细胞因子 IL-1β、IL-6、TNF-α mRNA 表达亦明显高于正常对照组,抗炎细胞因子 IL-10 mRNA 表达则明显低于正常对照

组,差异均有统计学意义($P<0.0001$, $P=0.0002$, $P<0.0001$, $P<0.0001$;图2)。此外,GERD组豚鼠体重增长幅度明显低于正常对照组(P 均 <0.05 ;图3)。



注:GERD为胃食管反流病

A、B:食管组织学改变(HE染色,比例尺=200 μm);C、D:A、B虚线框内放大图(HE染色,比例尺=50 μm)

图1 正常对照组和GERD组豚鼠食管组织学改变

表2 食管炎症组织学评分标准和两组评分比较

组织学特点	评分标准	正常对照组 ($\bar{x}\pm s$)	GERD组 ($\bar{x}\pm s$)
上皮内炎症细胞浸润	0(无),1(存在)	0.33±0.47	1.00±0.00
基底层/黏膜层比值	0(<15%) 1(15%~30%) 2(>30%)	0.33±0.47	1.67±0.47
固有层乳头/黏膜层比值	0(<50%) 1(50%~75%) 2(>75%)	1.33±0.94	1.67±0.47
乳头顶端黏膜毛细 血管充血	0(无),1(存在)	0	1.00±0.00
膨胀苍白的球状鳞状 上皮细胞	0(无),1(存在)	0	1.00±0.00
细胞间隙扩大	0(无),1(存在)	0	1.00±0.00
有糜烂或溃疡	0(无),1(存在)	0	0.33±0.47
综合损伤评分	病变严重程度评分 之和/总分(9分)	0.22±0.45	0.85±0.43

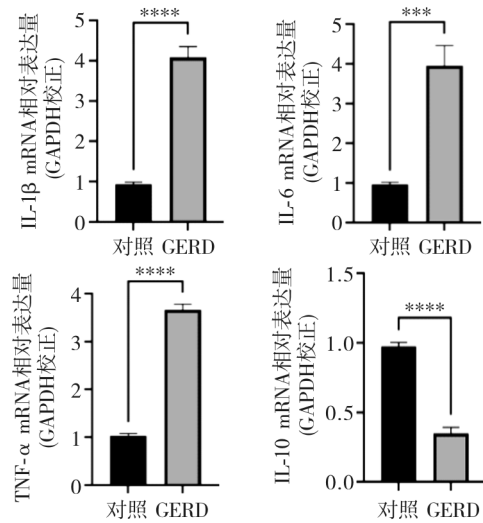
注:GERD为胃食管反流病

二、GERD豚鼠模型HRV增高

分别于造模前后对实验动物行HRV测量,结果显示造模前正常对照组与GERD组LF/HF比值差异无统计学意义($P=0.47$);造模28d后,GERD组LF/HF比值明显高于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.0001$;表3)。

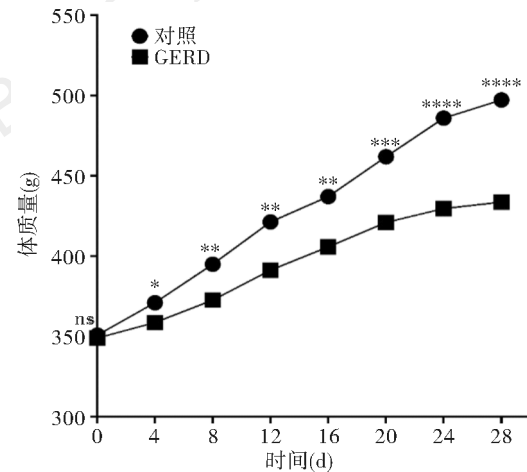
三、TRPV1、NaV1.8在食管组织中的表达

双重免疫荧光染色显示,在豚鼠食管组织中,TRPV1、NaV1.8主要表达于食管黏膜上皮,且两者



注:IL为白细胞介素;TNF-α为肿瘤坏死因子-α;GAPDH为磷酸甘油醛脱氢酶(内参);与正常对照组相比,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$

图2 正常对照组和GERD组豚鼠食管组织促炎、抗炎细胞因子mRNA表达比较



注:GERD为胃食管反流病;与正常对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$,^{ns} $P>0.05$

图3 正常对照组和GERD组豚鼠体质量变化曲线

表3 正常对照组和GERD组豚鼠造模前后HRV比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	LF (Hz)	HF (Hz)	LF/HF
造模前				
正常对照组	6	0.033 5±0.020 6	0.277 8±0.159 4	0.127 4±0.081 9
GERD组	6	0.075 9±0.073 6	0.438 9±0.254 5	0.147 6±0.067 3
造模28 d				
正常对照组	6	0.029 2±0.013 9	0.410 4±0.155 2	0.069 8±0.014 0
GERD组	6	0.370 2±0.298 5	0.799 9±0.563 3	0.434 5±0.085 7

注:GERD为胃食管反流病;HRV为心率变异性;LF为低频;HF为高频
存在共表达,GERD组两者表达和共表达量均明显高于正常对照组,差异有统计学意义(P 均 <0.05 ;图4、表4);qRT-PCR法和蛋白质印迹法结果亦表

明,与正常对照组相比,GERD组食管组织TRPV1、NaV1.8 mRNA和蛋白表达明显上调,差异均有统计学意义(P 均 <0.05 ;图5)。

表4 正常对照组和GERD组豚鼠食管组织TRPV1、NaV1.8表达和共表达比较($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	TRPV1表达	NaV1.8表达	共表达
正常对照组	6.50±1.84	8.68±0.95	6.08±2.37
GERD组	37.04±7.52	50.75±0.72	34.09±7.73
P 值	0.002 4	$<0.000 1$	0.003 9

注:GERD为胃食管反流病;TRPV1为瞬时受体电位香草酸亚型1;NaV1.8为电压门控钠离子通道1.8

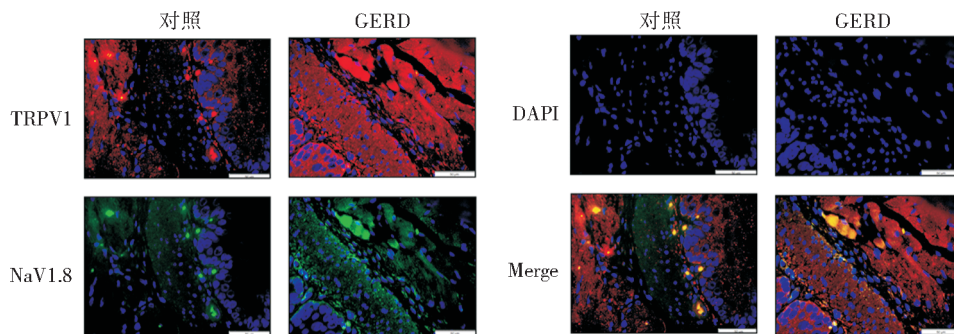
四、TRPV1、NaV1.8在迷走神经结状神经节中

的表达

双重免疫荧光染色显示,在豚鼠迷走神经结状神经节中,正常对照组与GERD组TRPV1、NaV1.8表达和共表达量差异均无统计学意义(P 均 >0.05 ;图6、表5);qRT-PCR法和蛋白质印迹法结果亦表明,与正常对照组相比,GERD组结状神经节TRPV1、NaV1.8 mRNA和蛋白表达未发生明显变化,差异均无统计学意义(P 均 >0.05 ;图7)。

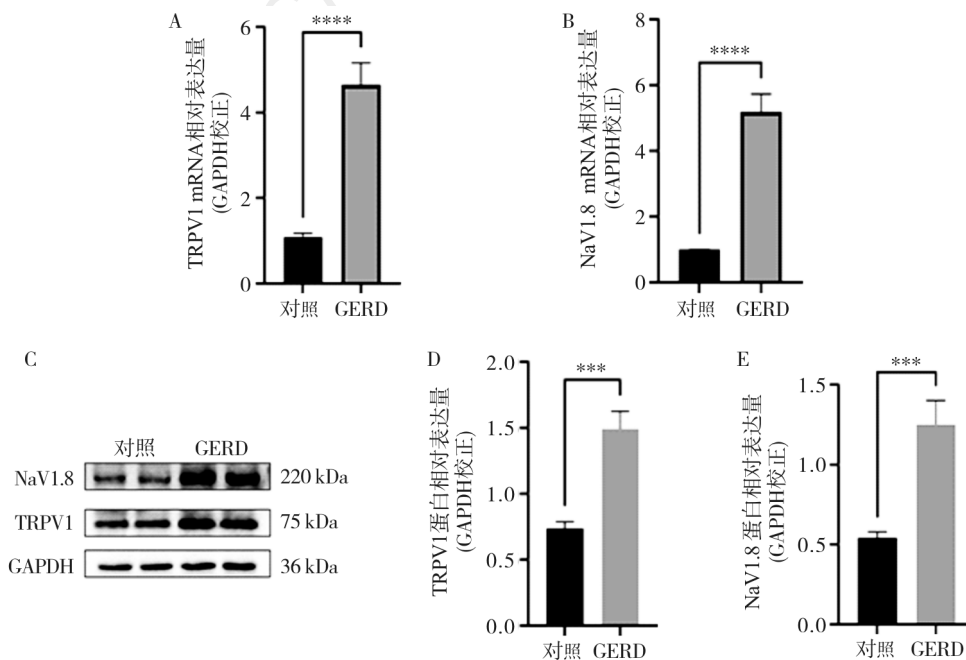
五、TRPV1、NaV1.8在迷走神经颈静脉神经节中的表达

双重免疫荧光染色显示,在豚鼠迷走神经颈静



注:GERD为胃食管反流病;TRPV1为瞬时受体电位香草酸亚型1;NaV1.8为电压门控钠离子通道1.8;DAPI为细胞核染料;Merge为合并图;双重免疫荧光染色(比例尺=50 μm)显示TRPV1、NaV1.8主要表达于食管黏膜上皮,GERD组两者表达和共表达量明显增高

图4 正常对照组和GERD组豚鼠食管组织TRPV1、NaV1.8表达和分布



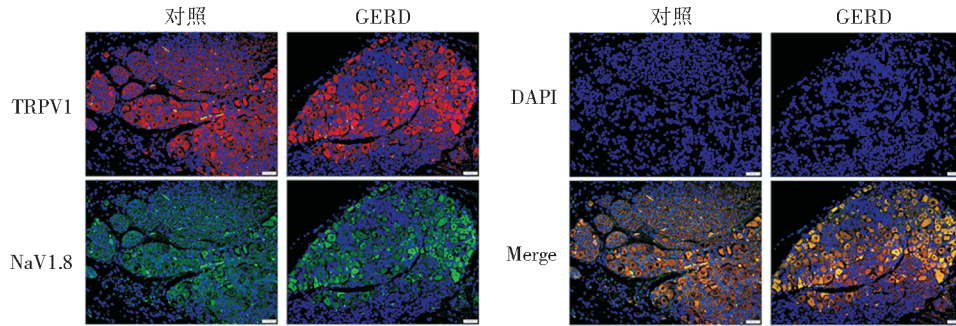
注:GERD为胃食管反流病;TRPV1为瞬时受体电位香草酸亚型1;NaV1.8为电压门控钠离子通道1.8;GAPDH为磷酸甘油醛脱氢酶(内参);1 Da=0.992 1 u;与正常对照组相比,*** $P<0.001$,**** $P<0.000 1$

A、B:GERD组食管组织TRPV1、NaV1.8 mRNA相对表达量较正常对照组明显增高;C:蛋白质印迹法电泳图;D、E:GERD组食管组织TRPV1、NaV1.8蛋白相对表达量较正常对照组明显增高

图5 正常对照组和GERD组豚鼠食管组织TRPV1、NaV1.8表达比较

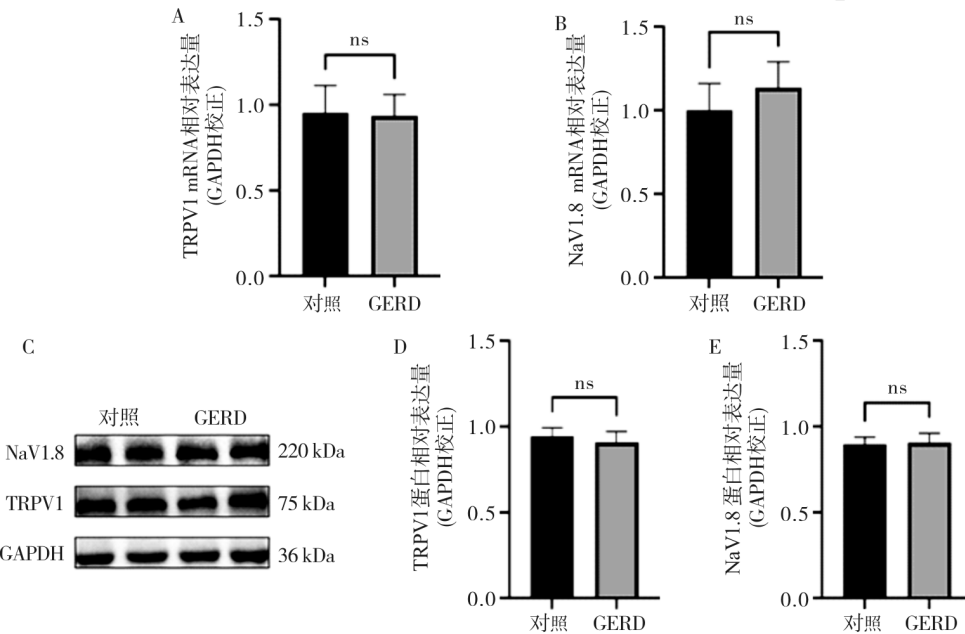
脉神经节中,GERD组 TRPV1、NaV1.8 表达和共表达量均明显高于正常对照组,差异有统计学意义(P 均 <0.05 ;图8、表6);qRT-PCR法和蛋白质印迹法

结果亦表明,与正常对照组相比,GERD组颈静脉神经节 TRPV1、NaV1.8 mRNA 和蛋白表达明显上调,差异均有统计学意义(P 均 <0.05 ;图9)。



注:GERD为胃食管反流病;TRPV1为瞬时受体电位香草酸亚型1;NaV1.8为电压门控钠离子通道1.8;DAPI为细胞核染料;Merge为合并图;双重免疫荧光染色(比例尺=50 μm)显示TRPV1、NaV1.8表达于结状神经节,正常对照组与GERD组两者表达和共表达量无明显差异

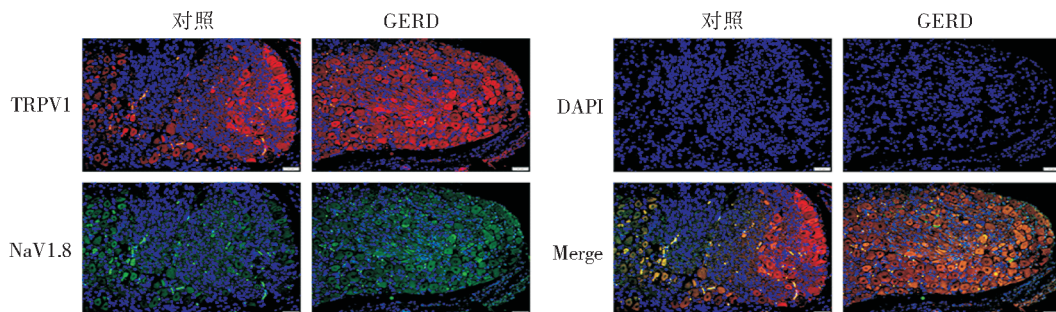
图6 正常对照组和GERD组豚鼠迷走神经结状神经节 TRPV1、NaV1.8表达和分布



注:GERD为胃食管反流病;TRPV1为瞬时受体电位香草酸亚型1;NaV1.8为电压门控钠离子通道1.8;GAPDH为磷酸甘油醛脱氢酶(内参);1 Da=0.992 1 u;与正常对照组相比, $^{**}P>0.05$

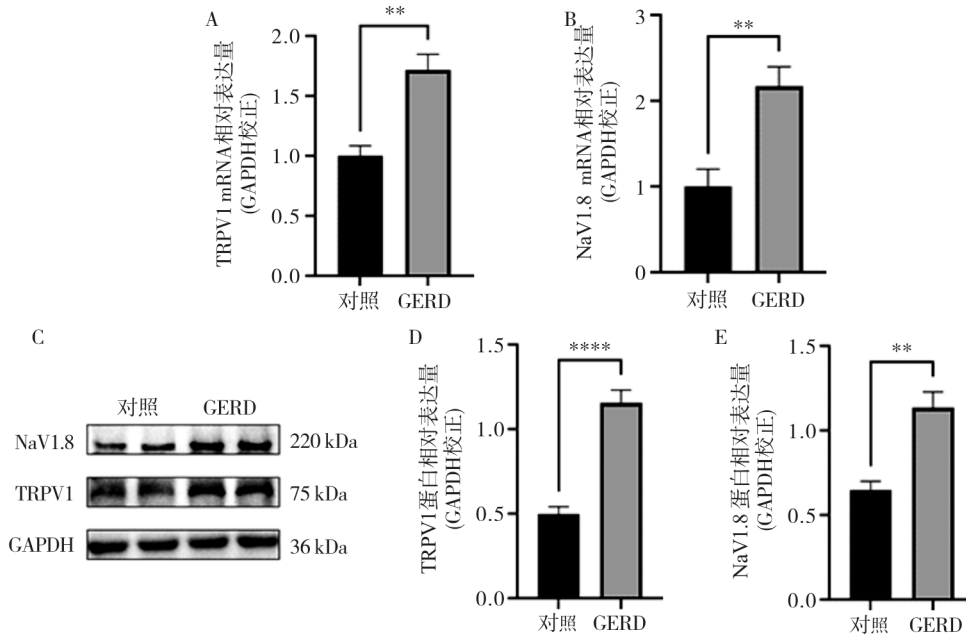
A、B:GERD组结状神经节 TRPV1、NaV1.8 mRNA 相对表达量与正常对照组相比无明显差异;C:蛋白质印迹法电泳图;D、E:正常对照组与GERD组结状神经节 TRPV1、NaV1.8 蛋白相对表达量无明显差异

图7 正常对照组和GERD组豚鼠迷走神经结状神经节 TRPV1、NaV1.8表达比较



注:GERD为胃食管反流病;TRPV1为瞬时受体电位香草酸亚型1;NaV1.8为电压门控钠离子通道1.8;DAPI为细胞核染料;Merge为合并图;双重免疫荧光染色(比例尺=50 μm)显示TRPV1、NaV1.8表达于颈静脉神经节,GERD组两者表达和共表达量明显增高

图8 正常对照组和GERD组豚鼠迷走神经颈静脉神经节 TRPV1、NaV1.8表达和分布



注:GERD 为胃食管反流病;TRPV1 为瞬时受体电位香草酸亚型 1;NaV1.8 为电压门控钠离子通道 1.8;GAPDH 为磷酸甘油醛脱氢酶(内参);1 Da=0.992 1 u;与正常对照组相比,** $P<0.01$,**** $P<0.000 1$

A、B:GERD 组颈静脉神经节 TRPV1、NaV1.8 mRNA 相对表达量较正常对照组明显增高;C:蛋白质印迹法电泳图;D、E:GERD 组颈静脉神经节 TRPV1、NaV1.8 蛋白相对表达量较正常对照组明显增高

图 9 正常对照组和 GERD 组豚鼠迷走神经颈静脉神经节 TRPV1、NaV1.8 表达比较

表 5 正常对照组和 GERD 组豚鼠迷走神经结状神经节 TRPV1、NaV1.8 表达和共表达比较($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	TRPV1 表达	NaV1.8 表达	共表达
正常对照组	37.21±3.34	45.82±16.46	34.22±1.06
GERD 组	37.13±7.06	40.76±4.81	32.31±1.47
P 值	0.986 8	0.636 6	0.142 2

注:GERD 为胃食管反流病;TRPV1 为瞬时受体电位香草酸亚型 1;NaV1.8 为电压门控钠离子通道 1.8

表 6 正常对照组和 GERD 组豚鼠迷走神经颈静脉神经节 TRPV1、NaV1.8 表达和共表达比较($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	TRPV1 表达	NaV1.8 表达	共表达
正常对照组	29.02±4.10	21.31±2.32	18.24±1.32
GERD 组	55.56±4.10	45.05±2.18	41.85±1.51
P 值	0.001 4	0.000 2	<0.000 1

注:GERD 为胃食管反流病;TRPV1 为瞬时受体电位香草酸亚型 1;NaV1.8 为电压门控钠离子通道 1.8

讨 论

GERD 是一种临床常见疾病,调查显示其发病率逐年上升且对经济产生直接和间接影响^[12]。当前 GERD 相关指南表明,具有典型症状的 GERD 患者应先接受质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI)

治疗 8 周,但有部分患者在接受 PPI 治疗后症状未能缓解或反复发作,且内镜检查结果无异常^[12]。Martinez 等^[13]的研究显示,内镜检查结果正常的 GERD 患者仅 45% 存在异常酸反流,推测食管高敏感可能是该类患者接受 PPI 治疗后症状不缓解或反复发作的原因。

食管感觉功能主要由迷走神经和脊神经中的初级感觉传入神经支配^[1]。食管迷走神经包含运动、感觉和副交感神经成分,其初级感觉神经元胞体位于结状神经节和颈静脉神经节中,而食管脊髓初级感觉神经元胞体主要位于颈、胸部 DRG 中,发出的感觉性纤维与前根发出的运动性纤维汇合组成脊神经。既往观点认为食管的伤害性刺激主要由脊神经感知,迷走神经则主要参与生理功能如吞咽和食管运动反射的调节^[14]。然而,有研究^[4]表明食管酸灌注可引起迷走神经元兴奋性增加,迷走神经可能是传导酸诱发的食管伤害性感觉的主要通路。更有临床研究^[15]表明,通过经皮迷走神经刺激改变迷走神经功能可预防并逆转酸诱发的食管痛觉过敏。内脏高敏感状态可触发痛觉过敏和交感-迷走神经功能失衡^[16],HRV 相关指标 LF/HF 比值可间接反映交感-迷走神经平衡^[17],因此可利用该指标反映

内脏高敏感状态。本研究通过记录实验动物静息状态下的心电图并分析HRV相关指标评估内脏高敏感程度,结果显示GERD组豚鼠的LF/HF比值在造模前与正常对照组相比无明显差异,造模28 d后则显著增高,表明GERD模型豚鼠存在明显的交感-迷走神经功能失衡,提示其存在食管高敏感,与既往动物实验研究结果一致^[18]。

对健康人和非糜烂性反流病(nonerosive reflux disease, NERD)患者食管感觉和神经分布的研究显示,烧心症状的产生与TRPV1介导的食管高敏感密切相关^[19-21]。对豚鼠嗜酸性食管炎模型的研究^[22]也发现,迷走神经感觉神经元对酸的敏感性增加,这一增敏效应主要是由TRPV1所介导。小鼠模型研究同样表明,酸内容物反流入食管时,食管上皮细胞中的TRPV1表达显著上调,离子通道活性增强^[23],而TRPV1拮抗剂AMG9810已被证明可抑制酸诱导的迷走神经传入纤维兴奋^[4,22,24]。本研究采用免疫荧光染色证实TRPV1表达于食管黏膜上皮以及迷走神经结状神经节和颈静脉神经节,分别以qRT-PCR、蛋白质印迹法和免疫荧光法检测TRPV1表达,结果显示在GERD豚鼠模型中,TRPV1在食管黏膜上皮、颈静脉神经节中的表达均显著上调,在结状神经节中的表达则未发生明显变化,通过在体实验验证了既往离体实验的结果^[4]。TRPV1参与了食管对酸暴露的反应,其在迷走神经通路中可能通过影响感觉信号的产生以及迷走神经功能参与介导酸诱导的食管高敏感,且颈静脉神经节为主要的传递信息神经元。

Nav1.8广泛分布于感觉神经元表面,与炎性疼痛和内脏高敏感密切相关^[5-6]。Laird等^[25]的动物实验发现,Nav1.8缺陷小鼠结肠内给予辣椒素或芥子油并不引发结肠痛觉过敏。Yoshimura等^[26]的研究也显示,抑制Nav1.8表达及其活性可抑制大鼠膀胱内酸灌注引发的痛觉过敏。上述研究结果表明,Nav1.8通道的打开和Na⁺流入对动作电位的产生和感觉传递至关重要。本研究通过免疫荧光染色以及qRT-PCR和蛋白质印迹法证实,Nav1.8在食管黏膜上皮、迷走神经结状神经节和颈静脉神经节中均有表达,与正常对照组相比,其在GERD豚鼠模型食管黏膜上皮、颈静脉神经节中的表达显著上调,在结状神经节中的表达则无明显变化。在迷走神经

通路中,Nav1.8表达上调可能通过影响迷走神经功能诱发食管高敏感,且颈静脉神经节为迷走神经通路中主要的传递信息神经元。此外,双重免疫荧光染色表明TRPV1与Nav1.8存在共表达,GERD豚鼠模型食管黏膜上皮和颈静脉神经节中两者的共表达比例较正常对照组显著增加,提示TRPV1与Nav1.8在介导食管高敏感的发生中可能具有协同作用。

综上所述,本研究通过动物在体实验证实,在食管酸暴露的情况下,迷走神经通路参与介导了食管高敏感的发生。GERD豚鼠模型食管黏膜上皮TRPV1、Nav1.8表达增高,两者在迷走神经颈静脉神经节中的表达亦显著上调,增加迷走神经兴奋性,促进迷走神经通路伤害性信号的传递,最终导致食管高敏感发生。TRPV1和Nav1.8系通过何种机制影响迷走神经功能,以及两者间的具体联系,有待后续研究进一步探讨。

参考文献

- [1] 吴白馨,沈磊,余晓云. 食管感觉性受体信号通路在食管高敏感发生中的作用[J]. 胃肠病学, 2022, 27 (4): 250-253.
- [2] BLACKSHAW L A. Transient receptor potential cation channels in visceral sensory pathways[J]. Br J Pharmacol, 2014, 171 (10): 2528-2536.
- [3] MATTHEWS P J, AZIZ Q, FACER P, et al. Increased capsaicin receptor TRPV1 nerve fibres in the inflamed human oesophagus[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2004, 16 (9): 897-902.
- [4] YU X, HU Y, YU S. Effects of acid on vagal nociceptive afferent subtypes in guinea pig esophagus[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2014, 307 (4): G471-G478.
- [5] XUE Y, CHIDIAC C, HERAULT Y, et al. Pain behavior in SCN9A (Nav1.7) and SCN10A (Nav1.8) mutant rodent models[J]. Neurosci Lett, 2021, 753: 135844.
- [6] LIN YM, FU Y, WINSTON J, et al. Pathogenesis of abdominal pain in bowel obstruction: role of mechanical stress-induced upregulation of nerve growth factor in gut smooth muscle cells[J]. Pain, 2017, 158 (4): 583-592.
- [7] SHIELDS S D, AHN H S, YANG Y, et al. Nav1.8 expression is not restricted to nociceptors in mouse peripheral nervous system[J]. Pain, 2012, 153 (10): 2017-

- 2030.
- [8] KAO D J, LI A H, CHEN J C, et al. CC chemokine ligand 2 upregulates the current density and expression of TRPV1 channels and Nav1.8 sodium channels in dorsal root ganglion neurons[J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9: 189.
- [9] LI Q, KONG L, ZHANG S, et al. A novel external esophageal perfusion model for reflux - associated respiratory symptoms[J]. *Pathobiology*, 2010, 77 (3): 163-168.
- [10] 吴静,沈磊,余晓云,等. 反流性食管炎模型中 TRPV1 与 TRPM8 的关系[J]. *胃肠病学*, 2022, 27 (10): 577-582.
- [11] YERIAN L, FIOCCA R, MASTRACCI L, et al. Refinement and reproducibility of histologic criteria for the assessment of microscopic lesions in patients with gastroesophageal reflux disease: the Eohisto Project[J]. *Dig Dis Sci*, 2011, 56 (9): 2656-2665.
- [12] YOUNG A, KUMAR M A, THOTA P N. GERD: a practical approach[J]. *Cleve Clin J Med*, 2020, 87 (4): 223-230.
- [13] MARTINEZ S D, MALAGON I B, GAREWAL H S, et al. Non - erosive reflux disease (NERD): acid reflux and symptom patterns[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003, 17 (4): 537-545.
- [14] HARSANYIOVA J, RU F, ZATKO T, et al. Vagus nerves provide a robust afferent innervation of the mucosa throughout the body of the esophagus in the mouse[J]. *Dysphagia*, 2020, 35 (3): 471-478.
- [15] FARMER A D, ALBUSODA A, AMARASINGHE G, et al. Transcutaneous vagus nerve stimulation prevents the development of, and reverses, established oesophageal pain hypersensitivity[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2020, 52 (6): 988-996.
- [16] CIESIELCZYK K, FURGAŁA A, DOBREK Ł, et al. Altered sympathovagal balance and pain hypersensitivity in TNBS - induced colitis[J]. *Arch Med Sci*, 2017, 13 (1): 246-255.
- [17] SGOIFO A, CARNEVALI L, ALFONSO MDE L, et al. Autonomic dysfunction and heart rate variability in depression[J]. *Stress*, 2015, 18 (3): 343-352.
- [18] HAN X, ZHANG Y, LEE A, et al. Upregulation of acid sensing ion channels is associated with esophageal hypersensitivity in GERD[J]. *FASEB J*, 2022, 36 (1): e22083.
- [19] LEE R H, KORSAPATI H, BHALLA V, et al. Esophageal submucosal injection of capsaicin but not acid induces symptoms in normal subjects[J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2016, 22 (3): 436-443.
- [20] USTA OGLU 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.
- [21] USTA OGLU A, WOODLAND P. Esophageal afferent innervation and its role in gastro - esophageal reflux disease symptoms[J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2021, 37 (4): 372-377.
- [22] HU Y, LIU Z, YU X, et al. Increased acid responsiveness in vagal sensory neurons in a guinea pig model of eosinophilic esophagitis[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014, 307 (2): G149-G157.
- [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.
- [24] PELES S, MEDDA B K, ZHANG Z, et al. Differential effects of transient receptor vanilloid one (TRPV1) antagonists in acid - induced excitation of esophageal vagal afferent fibers of rats[J]. *Neuroscience*, 2009, 161 (2): 515-525.
- [25] LAIRD J M, SOUSLOVA V, WOOD J N, et al. Deficits in visceral pain and referred hyperalgesia in Nav1.8 (SNS/PN3)-null mice[J]. *J Neurosci*, 2002, 22 (19): 8352-8356.
- [26] YOSHIMURA N, SEKI S, NOVAKOVIC S D, et al. The involvement of the tetrodotoxin-resistant sodium channel Na(v)1.8 (PN3/SNS) in a rat model of visceral pain[J]. *J Neurosci*, 2001, 21 (21): 8690-8696.

(2023-10-18 收稿; 2023-11-25 修回)

(本文编辑: 蒋晓玲)