

☆ XXXX ☆

基于NGF/TrkA信号通路探讨电针改善肝胃不和型非糜烂性胃食管反流病大鼠中枢敏化的机制

汤明杰^{1,2}, 李映虹², 朱天宜¹, 谢中祺¹, 郑诗仪¹, 徐航¹, 许林玲¹, 许萍萍¹, 张彩荣¹, 陈朝明¹
(¹南京中医药大学附属南京中医院, 南京 210022; ²南京中医药大学, 南京 210023)

【摘要】 目的:观察电针对肝胃不和型非糜烂性胃食管反流病(NERD)大鼠中枢敏化的影响,并探讨其作用机制。方法:雄性SD大鼠随机分为空白组、模型组、电针组、西药组,每组10只。除空白组外,其余3组采用基础致敏(腹腔注射卵清蛋白+氢氧化铝佐剂)联合夹尾刺激构建肝胃不和型NERD模型。电针组予电针“至阳”“神道”“大椎”“百会”,每次30 min,1次/d,连续2周。西药组予奥美拉唑(1.8 mg·kg⁻¹)灌胃,1次/d,连续2周。基础致敏后和干预结束后进行糖水偏好测试,并使用von Frey测痛仪测定大鼠的机械缩足反射阈值(MWT)。干预结束后,进行腹壁撤退反射(AWR)实验,最后进行食管酸灌注实验,灌注完成后处死大鼠并取材。采用透射电镜观察大鼠脊髓突触囊泡数量和食管黏膜上皮细胞间隙;ELISA法检测血清中胃泌素(GAS)和胃动素(MTL)含量;Western blot法检测脊髓神经生长因子(NGF)、酪氨酸激酶A(TrkA)、谷氨酸受体AMPA型亚基1(GluA1)、突触后致密蛋白95(PSD95)蛋白表达水平;qPCR法检测脊髓NGF、TrkA mRNA表达水平;免疫荧光法检测脊髓GluA1、PSD95蛋白表达水平。结果:与空白组相比,模型组大鼠糖水偏好率降低($P<0.01$),MWT降低($P<0.01$),扩张压力为40、60、80 mmHg时AWR评分均升高($P<0.01$),内脏疼痛阈值降低($P<0.01$),脊髓突触囊泡数量明显增多,食管黏膜上皮细胞间隙明显增宽,血清GAS、MTL含量降低($P<0.01$),脊髓组织中NGF、TrkA、GluA1、PSD95蛋白表达升高($P<0.01$),NGF、TrkA mRNA表达升高($P<0.01$),GluA1、PSD95蛋白平均荧光强度升高($P<0.01$)。与模型组比较,电针组和西药组糖水偏好率、MWT、内脏疼痛阈值、血清MTL含量升高($P<0.01, P<0.05$),压力为40 mmHg时AWR评分下降($P<0.01, P<0.05$),脊髓组织NGF、PSD95、TrkA蛋白表达降低($P<0.01, P<0.05$),TrkA mRNA表达降低($P<0.01, P<0.05$)。电针组压力为60、80 mmHg时AWR评分及血清GAS含量升高($P<0.01$),脊髓组织NGF mRNA表达降低($P<0.01$),GluA1、PSD95平均荧光强度降低($P<0.01$)。电针组和西药组大鼠的脊髓突触囊泡数量明显减少,食管黏膜上皮细胞间隙亦趋于恢复。与电针组比较,西药组的内脏疼痛阈值、MWT下降($P<0.01$)。结论:电针能够缓解肝胃不和型NERD大鼠的内脏高敏反应,降低中枢敏化,其机制可能与抑制NGF/TrkA通路有关。

【关键词】 非糜烂性胃食管反流病;针刺;内脏高敏;中枢敏化;脊髓NGF/TrkA信号通路

Mechanism of electroacupuncture in improving central sensitization in rats with non-erosive reflux disease of liver-stomach disharmony pattern based on NGF/TrkA signaling pathway

TANG Ming-jie^{1,2}, LI Ying-hong², ZHU Tian-yi¹, XIE Zhong-qi¹, ZHENG Shi-yi¹, XU hang¹, XU Lin-ling¹, XU Ping-ping¹, ZHANG Cai-rong¹, CHEN Chao-ming¹ (¹Nanjing Chinese Medicine Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210022, China; ²Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023)

【ABSTRACT】 **Objective** To investigate the effect of electroacupuncture (EA) on central sensitization in rats with non-erosive reflux disease (NERD) of liver-stomach disharmony pattern, so as to explore its underlying mechanisms in

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20260161

引用格式:汤明杰,李映虹,朱天宜,等.基于NGF/TrkA信号通路探讨电针改善肝胃不和型非糜烂性胃食管反流病大鼠中枢敏化的机制[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-10.

项目来源:江苏省中医药科技发展计划项目(No.YB2020028);南京市卫生科技发展项目(No.ZKX24044);江苏省研究生实践创新计划项目(No.SJXC25_1051);第六批南京市老中医药专家学术经验继承项目(No.2024NJLPSC);陈朝明名中医工作室基层工作站(No.2024-SJJCGZZ)

通信作者:陈朝明, E-mail: czm6704@163.com

improving NERD. **Methods** Forty male SD rats were randomly divided into control, model, EA, and medication (western medicine) groups ($n=10$ per group). The NERD model of liver-stomach disharmony pattern was established by intraperitoneal injection of ovalbumin plus aluminum hydroxide adjuvant (basic sensitization) combined with chronic tail-pinching stress stimulation. Rats in the EA group received EA stimulation (2 Hz, a strength that could induce a slight tremor of the limbs) at “Zhiyang” (GV9), “Shendao” (GV11), “Dazhui” (GV14), and “Baihui” (GV20) for 30 min, once daily for two consecutive weeks. Rats of the medication group received gavage of omeprazole ($1.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) once daily for two weeks. The remaining two groups were administered an equal volume of distilled water. Before and after the intervention, the sucrose preference test was performed, and the mechanical withdrawal threshold (MWT) was measured using von Frey filaments. After the intervention, the abdominal withdrawal reflex (AWR) test was conducted, followed by an esophageal acid perfusion test. After perfusion, the rats were euthanized for tissue collection. The number of synaptic vesicles in the spinal cord dorsal horns and the intercellular space of the esophageal mucosal epithelium were observed by transmission electron microscopy (TEM). The contents of serum gastrin (GAS) and motilin (MTL) were measured by ELISA. The protein expression levels of nerve growth factor (NGF), tropomyosin receptor kinase A (TrkA), glutamate receptor AMPA type subunit 1 (GluA1), and postsynaptic density protein 95 (PSD95) in the spinal cord tissue were detected by Western blot, and the mRNA expression levels of NGF and TrkA in the spinal cord were measured by RT-qPCR. The protein expression of GluA1 and PSD95 in the spinal cord was also assessed by immunofluorescence staining. **Results** Compared with the control group, the model group showed a significant decrease in the sucrose preference rate, MWT, body weight, visceral pain threshold, and serum GAS and MTL contents ($P<0.01$), and a significant increase in the AWR score of 40, 60, and 80 mmHg ($P<0.01$), number of spinal synaptic vesicles, expression levels of NGF, TrkA, GluA1 and PSD95 proteins, and NGF and TrkA mRNAs, as well as the immunofluorescence intensity of GluA1 and PSD95 ($P<0.01$). Following the intervention, the modeling induced decrease and increase of all the indexes (except for GluA1 protein expression) mentioned above in the EA group, and the modeling induced decreased levels of sucrose preference rate, MWT, body weight, visceral pain threshold, serum MTL, and the increased levels of the expression of NGF, TrkA, GluA1 and PSD95 proteins and TrkA mRNA in the medication group were reversed ($P<0.01$, $P<0.05$). The effect of EA was obviously superior to medication in up-regulating the levels of MWT and visceral pain threshold ($P<0.01$). Results of TEM showed that in comparison with the control group, the number of synaptic vesicles in the spinal cord was increased, and the intercellular spaces of esophageal mucosal epithelial cells were apparently widened in the model group, while after EA intervention, the number of synaptic vesicles was significantly decreased, and the intercellular spaces of esophageal mucosal epithelial cells tended to recover.

【KEYWORDS】 Non-erosive reflux disease; Electroacupuncture; Visceral hypersensitivity; Central sensitization; Spinal cord; NGF/TrkA signaling pathway

非糜烂性胃食管反流病(NERD)是胃食管反流病(GERD)最常见的亚型,占其60%以上,其临床特征表现为典型的反流、胃灼热等症状,但内镜下未见食管黏膜糜烂或Barrett食管等器质性改变^[1-2]。近年来,GERD发病率逐渐上升,中国GERD的患病率约为8.7%^[3]。NERD作为常见亚型,其病程多迁延反复,并常伴有焦虑、抑郁等情绪障碍,严重影响患者的生活质量^[4]。目前,西医治疗以抑酸、促胃肠动力为主,虽可短期控制症状,但存在耐药、药物不良反应、停药后复发率高等多重挑战^[5]。因此,探索安全有效的NERD治疗策略具有重要意义。

近年来,内脏高敏感被认为是功能性胃肠病症状产生与持续的核心机制之一^[6]。其中神经生长因子(NGF)及其高亲和力受体酪氨酸激酶A(TrkA)

构成的信号通路,在介导外周伤害性信息向中枢传递、促进脊髓及高位中枢的突触可塑性变化中发挥关键作用,是导致内脏痛觉过敏的重要基础^[7]。有研究显示,NERD患者常合并存在焦虑抑郁情绪,且血清NGF水平显著升高^[8]。在中医理论中,NERD多归属于“吐酸”“嘈杂”等范畴,本病多责之肝胃不和,肝失疏泄则横逆犯胃,胃失和降,胃气挟酸上逆,发为反酸、胃灼热。研究显示,肝胃不和型NERD占有证型的21.43%,占比最高^[9]。

课题组前期研究证实,电针不仅能有效缓解NERD患者反酸、胃灼热等核心症状,还可以改善其焦虑抑郁情绪^[10],但其作用机制尚不明确。本研究旨在基于NGF/TrkA信号通路,探讨电针对肝胃不和型NERD大鼠的治疗作用及其对中枢敏化的

影响机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与分组

40 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,6~8 周龄,体质量(280±10)g,购于上海必凯科翼生物科技公司,生产许可证号:SCXK(沪)2023-0009。大鼠分笼饲养于江苏卫生健康职业学院实验动物中心,室温(24±2)℃,相对湿度 55%,自由饮水摄食。大鼠适应性喂养 1 周后,按照随机数字表法分为空白组、模型组、电针组、西药组,每组 10 只。本研究通过江苏卫生健康职业学院实验动物伦理委员会审定(伦理号:JHVC-IACUC-2025-B046)。实验过程遵循科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》相关规定。

1.2 主要试剂和仪器

异氟烷(深圳铭网科技),卵清蛋白(北京索莱宝),氢氧化铝佐剂(美国 Sigma-Aldrich),0.1 mol·L⁻¹盐酸(深圳福林),NGF 抗体、TrkA 抗体(美国 Affinity),谷氨酸受体 AMPA 型亚基 1(GluA1)抗体、突触后致密蛋白 95(PSD95)抗体、β-actin 抗体、HRP 标记的羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗(武汉三鹰),RIPA 细胞裂解液、DAPI(上海碧云天),大鼠胃泌素(GAS)、胃动素(MTL)ELISA 试剂盒(南京拉普达),ECL 发光液(上海天能),BCA 蛋白浓度测定试剂盒、蛋白 marker(美国 Thermo Fisher),cDNA 第一链合成试剂盒、高灵敏性染料法定量 PCR 检测试剂盒(南京诺唯赞),奥美拉唑肠溶片(厦门万全万特)。

一次性无菌针灸针(0.18 mm×13 mm)、SDZ-V 型华佗牌电子针疗仪(苏州医疗用品厂),von Frey 电子测痛仪(美国 IITC),全自动样品快速研磨仪(上海净信),台式高速离心机(北京大龙),全自动酶标仪(美国伯腾),电泳仪、化学发光成像系统(上海天能),荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher),小动物气体麻醉机(深圳瑞沃德),荧光显微镜(日本尼康),透射电镜(日本 Hitachi)。

1.3 造模方法

大鼠适应性饲养 1 周后,参考文献[11]结合夹尾刺激^[12-13]的方法构建肝胃不和型 NERD 模型,具体流程如下:于实验第 2 周,除空白组外,其余各组大鼠每日接受 1 次夹尾刺激,连续 7 d。刺激时,用固定铁笼的夹子钳夹大鼠尾巴中 1/3 处,持续 45 min,并于 20 min 时更换夹持位置以防止组织缺血损伤,

刺激强度以不破皮流血为度,如有擦伤立即以 0.5% 碘伏消毒。第 3 周,在继续应激的同时进行基础致敏,除空白组腹腔注射等量 0.9% 氯化钠溶液,其余各组大鼠均腹腔注射 1.5 mL 含卵清蛋白 100 mg 与氢氧化铝佐剂 200 mg 的混合液。随后进行 2 周干预,第 5 周进行食管酸灌注实验,方法如下:大鼠经异氟烷吸入麻醉后,取仰卧位固定。沿腹壁正中切口逐层切开,充分暴露胃壁;近贲门处作一直径约 1 mm 切口,置入引流管用于收集灌注液。术中维持麻醉状态。经口置入单腔灌注管,使其前端固定于食管下端处,导管尾端连接持续灌注泵,以 10 mL·h⁻¹的速率持续滴注 0.1 mol·L⁻¹盐酸 50 min。灌注结束后处死动物,取食管及脊髓组织备用。造模成功标准为:与空白组相比,造模大鼠糖水偏好率降低,腹壁撤退反射(AWR)评分上升,内脏疼痛阈值下降,机械缩足阈值降低,电镜下观察到脊髓突触囊泡数量增多,且大鼠食管黏膜上皮细胞间隙显著增宽提示造模成功^[14]。

1.4 干预方法

于基础致敏后,即第 3 周开始干预。电针组:取“至阳”“神道”“大椎”“百会”进行电针治疗。穴位定位参照《实验针灸学实验指导》^[15],将大鼠用自制固定袋俯卧位固定后,常规消毒,选用 0.18 mm×13 mm 一次性无菌针灸针,“百会”向前平刺 3 mm,“大椎”“至阳”“神道”向前斜刺 5 mm。“大椎”与“百会”,“至阳”与“神道”分别连接电针治疗仪一对导线,连续波,频率 2 Hz,强度以大鼠肢体轻微颤动为宜,每日 1 次,每次 30 min,连续治疗 2 周。西药组:参照《药理实验方法学》^[16],按体质量换算大鼠给药剂量给予奥美拉唑灌胃(1.8 mg·kg⁻¹),每日 1 次,连续 2 周。空白组和模型组:灌胃相同体积的蒸馏水,每日 1 次,连续 2 周,并进行与电针组相同方式的固定 30 min。

1.5 观察指标及检测方法

大鼠一般情况:观察各组造模前,基础致敏后和干预后大鼠的精神状态、毛色、进食饮水量及体质量变化等情况。

糖水偏好测试:于基础致敏后(第 3 周初)及干预结束(第 4 周末)时进行。适应期 3 d,第 1 天提供两瓶 1.5% 蔗糖水,第 2 天换为一瓶糖水与一瓶纯水,期间调换瓶位两次,第 3 天禁水。正式测试时,单笼大鼠同时接触预称重的糖水与纯水 4 h,结束后复称并计算糖水偏好指数(%)=糖水消耗量÷总液体消耗量×100%。

腹壁撤退反射实验:干预结束后,将带微型气囊的导管经肛门置入结肠下段并固定于尾部。大鼠清醒状态下,通过压力控制设备以20、40、60、80 mmHg的梯度依次施加结肠扩张刺激,每次刺激持续10 s,观察是否出现腹部收缩或背部拱起等反应,并参考文献[17-18]进行AWR评分。各压力点重复测试两次,每次间隔3 min,以引发明确腹壁撤退反射的最小压力值作为内脏疼痛阈值。

机械缩足反射阈值(MWT):在基础致敏后和干预结束后,采用von Frey电子测痛仪测定大鼠的MWT。测试部位选定为左侧后足底中部,每只大鼠接受5次刺激,刺激间隔为5 min。以刺激引发抬足或舔足等逃避反应作为阳性判断标准,记录相应重力值,并计算5次测量的平均值,即为该鼠的MWT。

取材方法:食管酸灌注完成后,过量麻醉处死大鼠,经腹主动脉采集全血3~5 mL,静置后4℃离心分离血清。于上腹部暴露食管,取远端约2 cm组织纵向剖开,切取1 mm×1 mm×1 mm的组织块,经0.9%氯化钠溶液漂洗后,置于4%多聚甲醛中进行固定,用于电镜观察。沿背部正中剪开皮肤与肌肉,移除椎骨以暴露脊髓。随后剥离硬脊膜,将脊髓组织置于0.9%氯化钠溶液中漂洗。截取腰(L)4~L5节段,将部分新鲜样本于4%多聚甲醛中固定,用于电镜观察与免疫荧光检测;剩余样本则置于-80℃保存,用于Western blot及qPCR检测。

透射电镜观察脊髓突触囊泡数量和食管黏膜上皮细胞间隙:将4%多聚甲醛固定后的食管和脊髓组织,进行1%锇酸4℃固定2 h,乙醇和丙醇脱水,包埋,其中脊髓在光镜下观察到脊髓背角部位,然后超薄切片60~80 nm,铀铅双染,室温干燥过夜,在电镜下观察脊髓背角突触结构和食管黏膜上皮细胞间隙,并拍照。在确认脊髓突触结构的基础上,对突触囊泡数量进行定性分析。

ELISA法检测血清中GAS和MTL含量:每组随机取6份血清样本,参照ELISA试剂盒说明书测定GAS与MTL含量。

Western blot法检测大鼠脊髓NGF、TrkA、GluA1、PSD95蛋白表达:从各组随机选取6只大鼠的冻存脊髓样本100 mg,解冻后置于RIPA裂解液中,经超声破碎与离心获取总蛋白上清。经BCA法定量后,取等量蛋白进行电泳,并转印至PVDF膜。用5%脱脂奶粉室温封闭1 h后,将膜与一抗(NGF 1:5 000、TrkA 1:10 000、GluA1 1:50 000、PSD95

1:10 000、 β -actin 1:5 000)于4℃孵育过夜, TBST洗涤后,与相应二抗(1:20 000)室温孵育2 h。经ECL化学发光法显影后,使用Image J分析蛋白条带灰度,以目的蛋白与内参 β -actin条带灰度值的比值表示其相对表达量,并以空白组为标准进行归一化。

实时荧光定量PCR法检测大鼠脊髓NGF、TrkA mRNA表达:每组随机选取6只大鼠的冻存脊髓样本50 mg,提取总RNA,随后参照cDNA第一链合成试剂盒说明书将其反转录为cDNA。qPCR反应参照高灵敏染料法荧光定量PCR试剂盒说明书进行,在PCR仪上以 β -actin作为内参完成扩增,循环设定条件:95℃预变性30 s;95℃变性20 s,60℃退火30 s,共40个循环。目标基因的相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

| 基因 | 序列(5'→3') | 产物长度/bp |
|----------------|-----------------------------|---------|
| NGF | 上游 CATCACTGTGGACCCCAAACTGT | 247 |
| | 下游 GTCCGTGGTGTGGTCTTATCTC | |
| TrkA | 上游 AACAAAGAAGAATGTGACGTGCTG | 119 |
| | 下游 TGATGCTGTTCCACGGCTT | |
| β -actin | 上游 TGCTATGTTGCCCTAGACTTCG | 240 |
| | 下游 GTTGGCATAGAGGTCTTTACGG | |

注:NGF为神经生长因子,TrkA为酪氨酸激酶A。

免疫荧光法检测大鼠脊髓GluA1、PSD95表达:每组随机抽取4只大鼠多聚甲醛固定的脊髓组织样本,首先使用0.2% Triton X-100溶液室温孵育10 min,随后以5% BSA(溶于PBS)室温封闭1 min。封闭后,样品与一抗(1:300)于4℃孵育过夜。次日经PBS漂洗后,与荧光二抗(1:400)室温避光孵育1 h,再次漂洗,DAPI染核5 min。最后以抗荧光淬灭封片剂封片,于荧光显微镜下观察并采集图像,荧光强度经Image J进行定量分析。

1.6 统计学处理

采用GraphPad Prism 10.1.2软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间比较用单因素方差分析,若满足方差齐性,组间两两比较采用LSD检验;若方差不齐,则两两比较采用Games-Howell检验。不符合正态分布的数据,采用非参数检验。以 $P\leq 0.05$ 为

差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

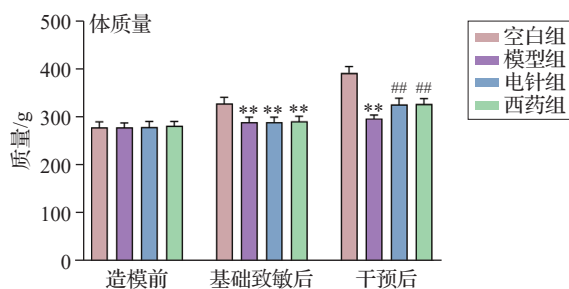
造模前,各组大鼠精神状态良好,摄食饮水正常,毛发自然光泽,各组大鼠体质量差异无统计学意义。基础致敏后,与空白组相比,其余3组大鼠均表现出典型的应激状态,摄食与饮水减少,毛发晦暗蓬松,易激惹,体质量降低($P<0.01$)。干预后,与空白组相比,模型组大鼠体质量降低($P<0.01$);与模型组相比,电针组和西药组均观察到动物应激反应减轻,同时伴随有摄食、饮水量的提升,体质量增加($P<0.01$)。见图1。

2.2 各组大鼠糖水偏好率比较

基础致敏后,与空白组比较,其余3组大鼠的糖水偏好率降低($P<0.01$)。干预后,与模型组比较,电针组和西药组糖水偏好率升高($P<0.01$)。西药组糖水偏好率与电针组比较差异无统计学意义。见图2。

2.3 各组大鼠腹壁撤退反射实验结果比较

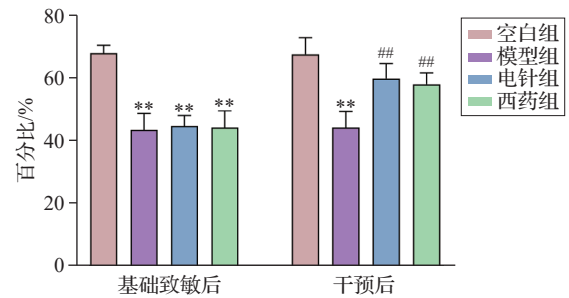
在压力为20 mmHg时,各组大鼠之间AWR评分差异无统计学意义。在压力为40、60、80 mmHg时,与空白组比较,模型组大鼠AWR评分上升($P<0.01$)。与模型组比较,电针组在压力为40、60、80 mmHg时AWR评分下降($P<0.01$),西药组在压力为40 mmHg时AWR评分下降($P<0.05$)。西药组与电针组在各压力段AWR评分差异无统计学意义。与空白组比较,模型组大鼠内脏疼痛阈值下降($P<0.01$)。与模型组比较,电针组和西药组的内脏疼痛阈值上升($P<0.01$)。与电针组比较,西药组的内脏疼痛阈值下降($P<0.01$)。见图3。



注:与同时点空白组比较,** $P<0.01$;与同时点模型组比较,## $P<0.01$ 。

图1 各组大鼠体质量比较($\bar{x}\pm s$,10只鼠/组)

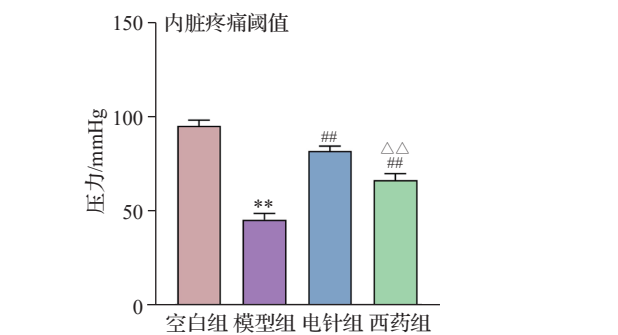
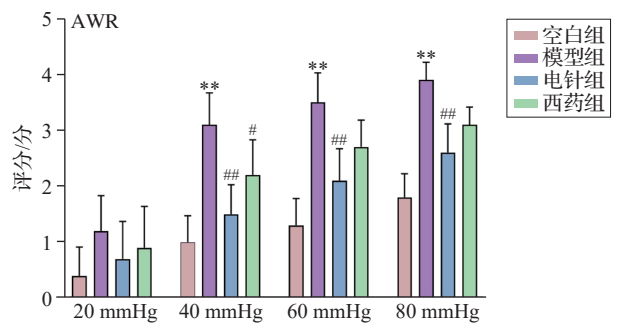
Fig. 1 Comparison of body weight of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 10 rats/group)



注:与同时点空白组比较,** $P<0.01$;与同时点模型组比较,## $P<0.01$ 。

图2 各组大鼠糖水偏好率比较($\bar{x}\pm s$,10只鼠/组)

Fig. 2 Comparison of sugar water preference rate of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 10 rats/group)



注:AWR为腹壁撤退反射。与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.05$,### $P<0.01$;与电针组比较,△△ $P<0.01$ 。

图3 各组大鼠AWR实验结果比较($\bar{x}\pm s$,10只鼠/组)

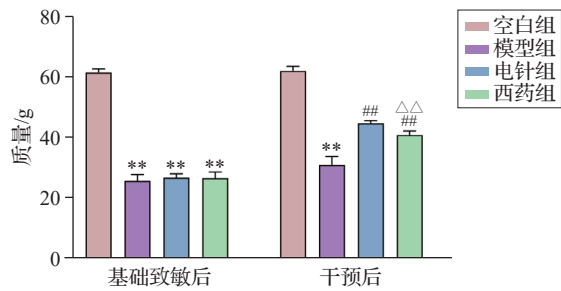
Fig. 3 Comparison of abdominal withdrawal reflex test results of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 10 rats/group)

2.4 各组大鼠MWT比较

基础致敏后,与空白组比较,其余3组大鼠的MWT降低($P<0.01$)。干预后,与空白组比较,模型组MWT降低($P<0.01$);与模型组比较,电针组和西药组的MWT升高($P<0.01$)。与电针组比较,西药组的MWT降低($P<0.01$)。见图4。

2.5 各组大鼠脊髓突触囊泡数量和食管黏膜上皮细胞间隙比较

电镜观察显示,与空白组相比,模型组大鼠脊髓突触囊泡数量增多,且食管黏膜上皮细胞间隙显



注: MWT为机械缩足反射阈值。与同时点空白组比较, ** $P < 0.01$; 与同时点模型组比较, ## $P < 0.01$, 与同时点电针组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图4 各组大鼠MWT比较($\bar{x} \pm s$, 10只鼠/组)
Fig. 4 Comparison of MWT of rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 10 rats/group)

显著增宽,提示造模成功。与模型组比较,电针组和西药组脊髓突触囊泡数量显著减少,食管黏膜上皮细胞间隙明显恢复。结果表明,电针可以修复食

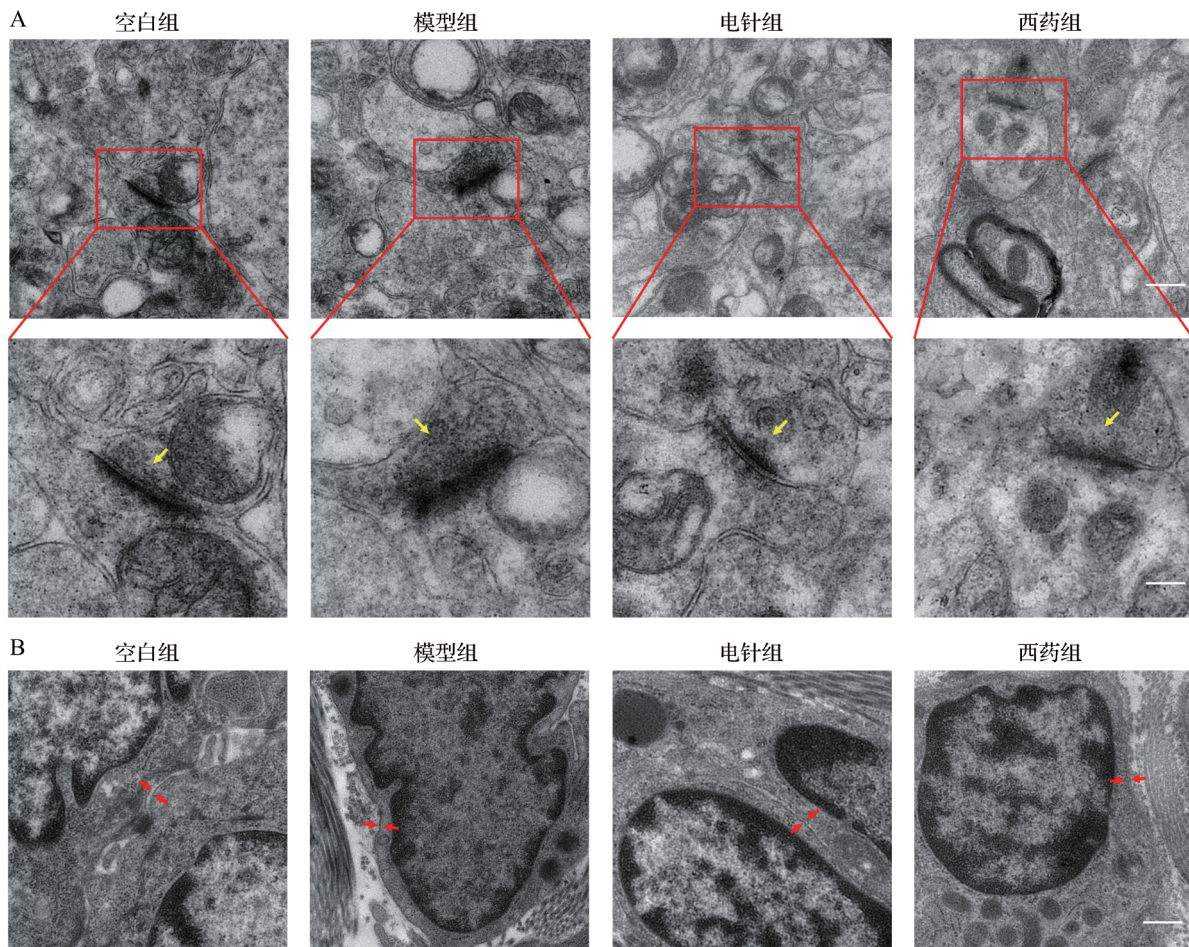
管黏膜屏障,并可能通过减少脊髓突触囊泡数量,改善肝胃不和型NERD模型大鼠的中枢敏化状态。见图5。

2.6 各组大鼠血清GAS、MTL含量比较

与空白组比较,模型组大鼠血清GAS、MTL含量降低($P < 0.01$)。与模型组相比,电针组大鼠血清GAS、MTL含量升高($P < 0.01, P < 0.05$),西药组大鼠血清MTL含量升高($P < 0.01$)。西药组与电针组比较差异无统计学意义。见图6。

2.7 各组大鼠脊髓NGF、TrkA、GluA1、PSD95蛋白表达比较

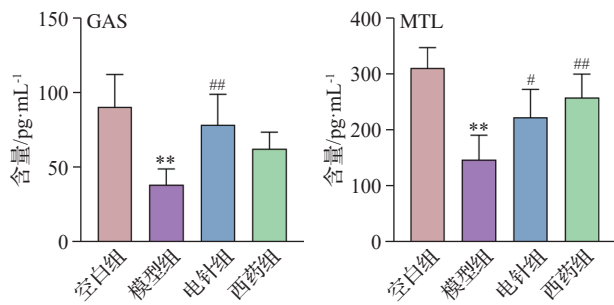
与空白组比较,模型组脊髓NGF、TrkA、GluA1、PSD95蛋白表达升高($P < 0.01$)。与模型组比较,电针组和西药组NGF、TrkA、PSD95蛋白表达降低($P < 0.01, P < 0.05$),西药组GluA1蛋白表达降低($P < 0.01$),西药组与电针组比较差异无统计学



注:A为脊髓组织,下排图片为上排图片框选处放大图,上排标尺=1 μm ,下排标尺=0.5 μm ; B为食管组织,标尺=1 μm 。黄色箭头示脊髓突触囊泡,红色双箭头示食管黏膜上皮细胞间隙。

图5 各组大鼠脊髓突触囊泡和食管黏膜上皮细胞间隙比较(透射电镜)

Fig. 5 Comparison of synaptic vesicles in the spinal cord and intercellular spaces of esophageal mucosal epithelial cells of rats in the 4 groups (transmission electron microscopy)



注:GAS为胃泌素,MTL为胃动素。与空白组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

图6 各组大鼠血清GAS、MTL含量比较($\bar{x} \pm s$,6只鼠/组)
Fig. 6 Comparison of serum GAS and MTL contents of rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 rats/group)

意义。见图7。

2.8 各组大鼠脊髓NGF、TrkA mRNA表达水平比较

与空白组比较,模型组脊髓NGF、TrkA mRNA表达升高($P < 0.01$)。与模型组比较,电针组脊髓NGF、TrkA mRNA表达降低($P < 0.01$),西药组TrkA mRNA表达降低($P < 0.05$)。西药组与电针组比较差异无统计学意义。见图8。

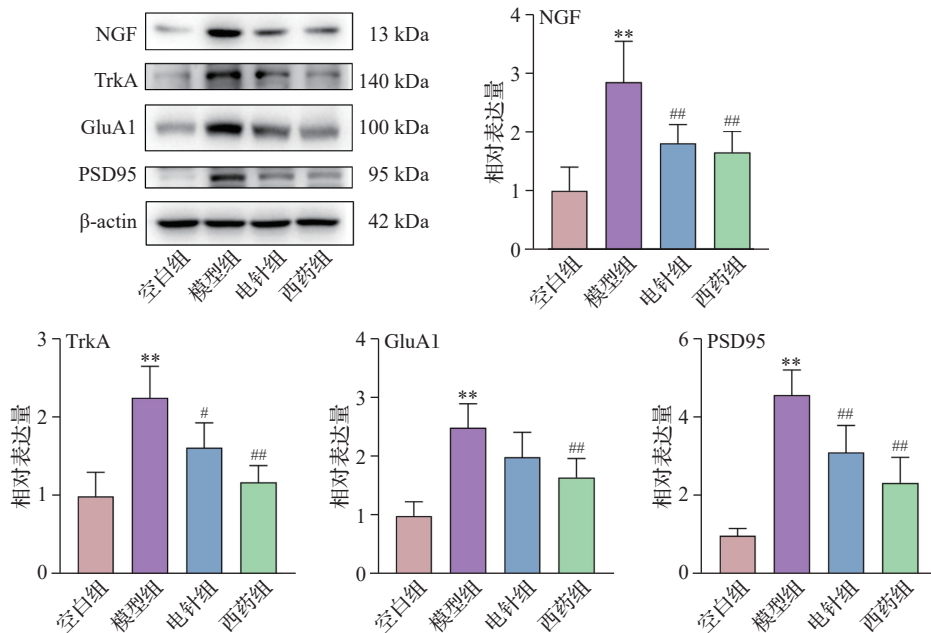
2.9 各组大鼠脊髓GluA1、PSD95蛋白平均荧光强度比较

与空白组比较,模型组脊髓GluA1、PSD95平

均荧光强度升高($P < 0.01$)。与模型组比较,电针组脊髓GluA1、PSD95平均荧光强度降低($P < 0.01$)。西药组与电针组比较差异无统计学意义。见图9。

3 讨论

前期临床研究已证实选取督脉经穴“百会”“大椎”“至阳”“神道”针刺治疗NERD安全有效^[10,19]。督脉作为“阳脉之海”,总督一身阳气,为十二经气血运行之主导。其次,肝主疏泄,其功能依赖于阳气温煦与推动;督脉阳气充盈、经气通畅,是肝气条达的重要动力来源。同时,督脉经气贯通上下,亦是脾胃气机升降有序的内在基础。因此,刺激上述督脉穴位可振奋督脉经气,进而调节肝胃枢机,达到治疗NERD的目的。百会位于巅顶,可升清降浊、平调逆气;大椎为诸阳之会,能振奋阳气、疏解瘀滞。神道与至阳均位于中焦,两穴协同可通调中焦气机、疏肝和胃。四穴共奏疏肝理气、和胃降逆之功。从现代医学角度看,针刺督脉经穴可能通过调节相应节段脊神经的功能,降低内脏传入神经的兴奋性,减少伤害性信息向中枢的传递,从而缓解食管内脏高敏感状态^[20]。此外,研究表明针刺“大椎”“百会”可经上行通路影响下丘脑、孤束核等自主神经调控中枢,调节交感-迷走神经平衡,进而改善胃肠动力与分泌功能^[21],这可能是其改善NERD

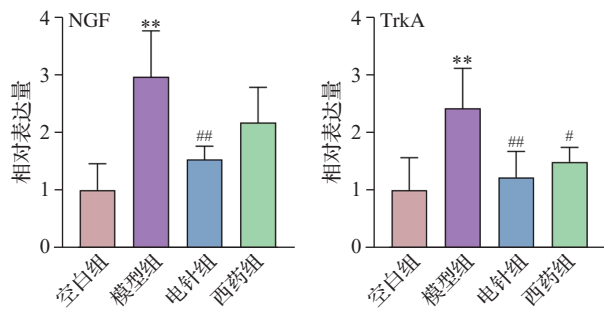


注:NGF为神经生长因子,TrkA为酪氨酸激酶A,GluA1为谷氨酸受体AMPA型亚基1,PSD95为突触后致密蛋白95。

与空白组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

图7 各组大鼠脊髓NGF、TrkA、GluA1、PSD95蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$,6只鼠/组)

Fig. 7 Comparison of NGF, TrkA, GluA1, and PSD95 protein expression in the spinal cord of rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 rats/group)



注:NGF为神经生长因子,TrkA为酪氨酸激酶A。与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

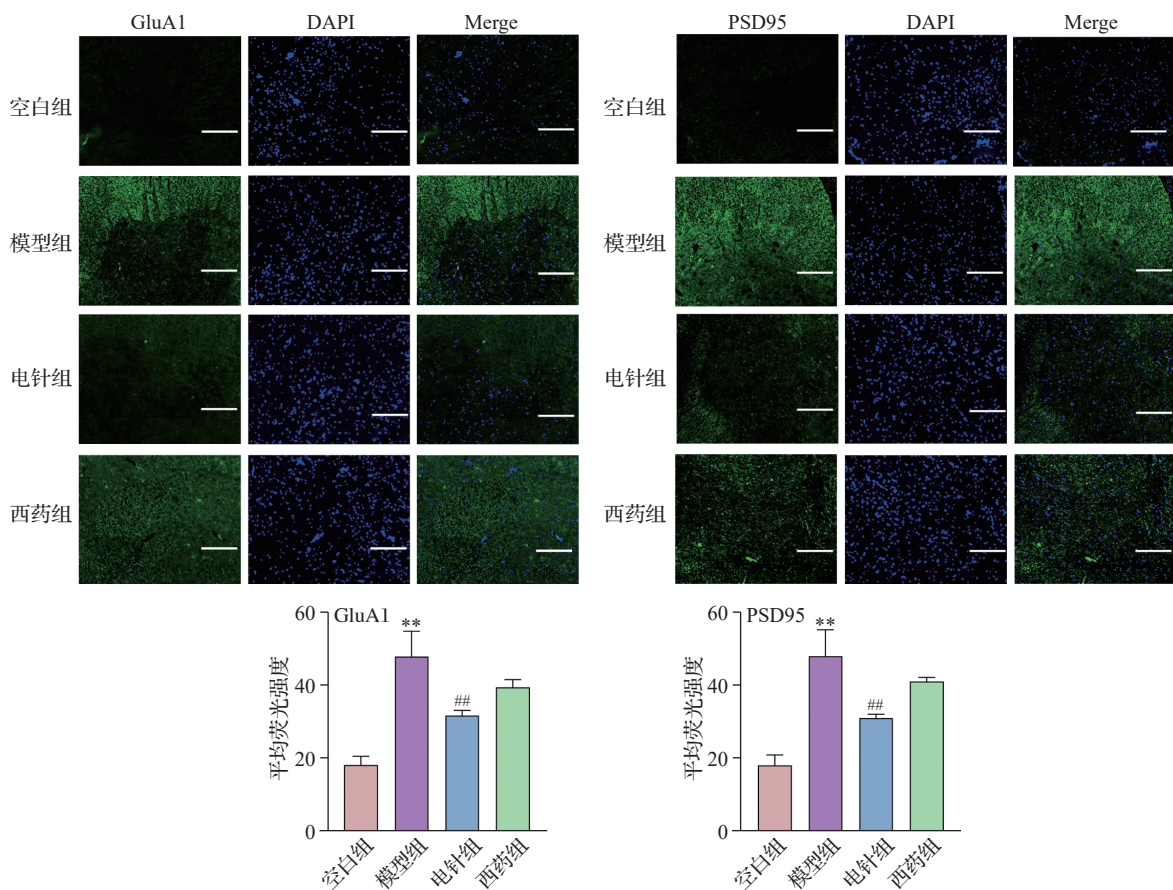
图8 各组大鼠脊髓NGF、TrkA mRNA表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

Fig. 8 Comparison of NGF and TrkA mRNA expression levels in the spinal cord of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$,6 rats/group)

合并情绪障碍的重要机制。

内脏高敏感是NERD的核心发病环节之一,心理应激作为常见诱因,与NERD常伴发的焦虑、抑

郁等情绪障碍相互促进,共同参与疾病进程^[22]。临床使用抗抑郁药物可改善部分患者症状^[23],提示心理应激可能通过调控中枢及外周神经功能,影响痛觉感知与胃肠动力,进而诱发内脏高敏感。本研究将MWT、AWR评分、内脏疼痛阈值作为量化内脏痛觉敏感性的核心行为学指标。MWT、内脏疼痛阈值的降低及AWR评分的升高可反映痛觉过敏状态,即机体对伤害性刺激的反应性增强^[17-18]。本实验结果显示,与空白组相比,肝胃不和型NERD模型大鼠的MWT和内脏疼痛阈值降低,AWR评分升高,脊髓突触囊泡数量增多,提示中枢敏化形成及突触可塑性改变。此外,模型组并伴随糖水偏好率下降,以及血清胃肠激素GAS、MTL含量降低,印证了肝胃不和证候中“肝郁”致情志失调、“胃逆”伴功能紊乱的病机特点。电针干预后,上述行为学、内分泌及分子指标均得到同步改善。西药组结果与电针组相近,但在改善内脏痛觉敏感性的指标上明显弱于电针组。NERD相关的食管高敏感涉



注:GluA1为谷氨酸受体AMPA型亚基1,PSD95为突触后致密蛋白95。蓝色为DAPI,绿色为GluA1或PSD95表达。

标尺=50 μm。与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

图9 各组大鼠脊髓GluA1、PSD95蛋白平均荧光强度比较 ($\bar{x}\pm s$,4只鼠/组)

Fig. 9 Comparison of the average fluorescence intensities of GluA1 and PSD95 proteins in the spinal cords of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$,4 rats/group)

及外周感受器敏化与中枢敏化双重机制。中枢敏化是指中枢神经系统对传入信号处理异常,导致痛觉放大、感觉阈值降低,并形成持续的高敏感状态^[24]。在脊髓层面,来自食管的内脏感觉信号由传入神经传递至背角神经元,当这些神经元被持续激活后,可进入一种长期兴奋状态,即“中枢敏化的持续化”^[25]。目前研究认为,NGF与其高亲和力受体TrkA结合后,可激活细胞内多种信号转导途径,影响突触可塑性与痛觉敏感性^[26]。该通路的异常激活可诱导细胞内钙离子释放,改变突触后膜电位稳定性,促使兴奋性突触后电位持续增强,从而加速痛觉信号的传递与整合。研究显示,NERD患者的焦虑评分与血清NGF含量成正相关^[8]。电针能够改善肠易激综合征大鼠内脏高敏感性和抑郁焦虑状态,其机制可能与下调NGF、TrkA表达有关^[27]。亦有研究证实,电针可能通过抑制NGF/TrkA通路改善功能性消化不良大鼠胃部高敏感性^[28]。本研究进一步提示,在NERD模型大鼠中,脊髓NGF、TrkA的蛋白及mRNA表达,以及PSD95、GluA1蛋白表达及平均荧光强度均显著升高;电针干预后可有效逆转上述指标的异常升高。这一结果提示,电针可能通过抑制NGF/TrkA通路及其下游突触重塑相关分子,缓解中枢敏化。中枢敏化的最终效应体现在突触结构和功能的持久性改变上。其中,PSD95作为突触后致密区的关键支架蛋白,通过与N-甲基-D-天冬氨酸受体、AMPA受体等相互作用,不仅参与维持受体稳定性,更在组织突触后致密区信号复合物的形成与功能整合中发挥核心作用,是调节突触可塑性的关键分子^[29]。AMPA受体亚基GluA1的功能调控是决定兴奋性突触传递强度的关键,因此构成了介导应激诱导内脏高敏感的核心分子环节之一。GluA1激活后介导的钠、钙离子内流,可进一步升高细胞内钙浓度,激活下游信号网络,最终维持中枢敏化状态^[30]。

综上所述,电针可能通过抑制NGF/TrkA信号通路,下调PSD95、GluA1蛋白的表达,从而改善中枢敏化状态,最终缓解肝胃不和型NERD大鼠的内脏高敏感反应。本研究仍存在一些局限性:其一,机制探讨主要集中于脊髓水平,未对可能参与中枢敏化的相关脑区如下丘脑、前额叶皮层等进行同步观察;其二,NGF/TrkA信号轴与下游突触可塑性蛋白之间的直接因果关联,有待通过该通路的特异性激动剂或抑制剂进行干预验证。因此,电针改善NERD中枢敏化的完整作用网络仍需进一步深入

探索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] SHAQRAN T M, ISMAEEL M M, ALNUAMAN A A, et al. Epidemiology, causes, and management of gastroesophageal reflux disease: a systematic review [J]. *Cureus*, 2023; 15(10):e47420.
- [2] MEHTA R S, STALLER K, CHAN A T. Review of gastroesophageal reflux disease [J]. *Jama*, 2021, 325(14): 1472.
- [3] LU T L, LI S R, ZHANG J M, et al. Meta-analysis on the epidemiology of gastroesophageal reflux disease in China [J]. *World J Gastroenterol*, 2022, 28(45): 6410-6420.
- [4] 韦瑞玲, 吴德卫, 刘杰, 等. 不同亚型难治性胃食管反流病患者心理状态分析 [J]. *安徽医学*, 2020, 41(8): 880-883.
WEI R L, WU D W, LIU J, et al. Analysis of mental state of refractory gastroesophageal reflux patients with different subtypes (in Chinese) [J]. *Anhui Medical Journal*, 2020, 41(8): 880-883.
- [5] ANDRAWES M, ANDRAWES W, DAS A, et al. Proton pump inhibitors (PPIs) -an evidence-based review of indications, efficacy, harms, and deprescribing [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2025, 61(9): 1569.
- [6] LASHGARI N A, ROUDSARI N M, MOMTAZ S, et al. Systematic review on herbal preparations for controlling visceral hypersensitivity in functional gastrointestinal disorders [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2024, 25(13): 1632-1650.
- [7] MARLIN M C, LI G P. Biogenesis and function of the NGF/TrkA signaling endosome [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2015, 314: 239-257.
- [8] 何美君, 白光, 李晶, 等. 疏肝降逆和胃方治疗肝胃不和型非糜烂性胃食管反流病临床研究 [J]. *陕西中医*, 2021, 42(11): 1539-1543.
HE M J, BAI G, LI J, et al. Clinical study on Shugan Jiangni Hewei recipe in treating non-erosive gastroesophageal reflux disease with disharmony of liver and stomach (in Chinese) [J]. *Shaanxi Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2021, 42(11): 1539-1543.
- [9] 秦书敏, 严景文, 梁祈皓, 等. 胃食管反流病证候及证素分布规律研究 [J]. *新中医*, 2024, 56(24): 64-69.
QIN S M, YAN J W, LIANG Q H, et al. Study on distribution rules of syndromes and syndrome elements of gastroesophageal reflux disease (in Chinese) [J]. *Journal of New Chinese Medicine*, 2024, 56(24): 64-69.
- [10] 顾茜彦, 陈贵生, 施大中, 等. 电针联合西药治疗非糜烂性反流病: 随机对照试验 [J/OL]. *中国针灸*, 2026; 1-12. (2026-02-06). <https://doi.org/10.13703/j.0255-2930.20250915-k0003>.
GU X Y, CHEN G S, SHI D Z, et al. Treatment of non-erosive reflux disease with electroacupuncture combined with western medicine: a randomized controlled trial [J/OL]. *Chinese Acupuncture & Moxibustion*, 2026; 1-12. (2026-02-06). <https://doi.org/10.13703/j.0255-2930.20250915-k0003>.
- [11] 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.
YANG M, CHEN D F, FANG D C. Establish and

- evaluation of the rat model of esophageal visceral hypersensitivity (in Chinese) [J]. *Journal of Regional Anatomy and Operative Surgery*, 2008, 17(2): 77-79.
- [12] 吕咪, 黄开月, 王小康, 等. 基于文献的胃食管反流病不同亚型动物模型构建方法的分析[J]. *中医杂志*, 2025, 66(13): 1386-1394.
- LYU M, HUANG K Y, WANG X K, et al. Analysis of animal model construction methods of different subtypes of gastroesophageal reflux disease based on literature (in Chinese) [J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2025, 66(13): 1386-1394.
- [13] 唐杜鹏, 陈朝元. 疏降饮对肝胃不和型反流性食管炎大鼠食管黏膜炎症的影响[J]. *医学理论与实践*, 2020, 33(14): 2241-2243.
- TANG D P, CHEN C Y. The effect of Shujiangyin on reflux esophagitis in rats (in Chinese) [J]. *The Journal of Medical Theory and Practice*, 2020, 33(14): 2241-2243.
- [14] 贾越博, 李晶, 赵佳琪, 等. 疏肝降逆和胃方抑制 NGF/TrkA 信号通路改善非糜烂性胃食管反流病肝郁气滞证大鼠的中枢敏化作用[J]. *中药新药与临床药理*, 2023, 34(8): 1034-1040.
- JIA Y B, LI J, ZHAO J Q, et al. Study on the Shugan Jiangni Hewei granules inhibits NGF/TrkA signaling pathway to improve central sensitization in rats with liver depression and *qi* stagnation syndrome of non-erosive reflux disease (in Chinese) [J]. *Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology*, 2023, 34(8): 1034-1040.
- [15] 郭义, 赵雪. 实验针灸学实验指导[M]. 5版. 北京: 中国中医药出版社, 2021.
- GUO Y, ZHAO X. Experimental guidance of experimental acupuncture (in Chinese) [M]. 5th edition. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2021.
- [16] 李元建, 魏伟, 吴希美. 药理实验方法学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- LI Y J, WEI W, WU X M. Methodology of pharmacological experiments (in Chinese) [M]. 4th edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2010.
- [17] 陈颖, 赵妍, 罗丹妮, 等. 腹壁撤退反射实验测量方法概述[J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(8): 89-93.
- CHEN Y, ZHAO Y, LUO D N, et al. A summary of measurement methods for abdominal withdrawal reflex test (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2017, 27(8): 89-93.
- [18] CHEN P, WANG C, GONG Q, et al. Alterations of endogenous pain-modulatory system of the cerebral cortex in the neuropathic pain [J]. *iScience*, 2023, 26(5): 106668.
- [19] 汤丽群, 李丹慧, 陈朝明. 通督导气法针刺联合整脊治疗非糜烂性反流病的临床观察[J]. *针灸临床杂志*, 2018, 34(4): 54-57.
- TANG L Q, LI D H, CHEN C M. Clinical observation of the combination of acupuncture with Tongdu Daoqi manipulat on and chiropractic in the treatment of NERD (in Chinese) [J]. *Journal of Clinical Acupuncture and Moxibustion*, 2018, 34(4): 54-57.
- [20] 丰金香. 督脉导气针刺法治疗非糜烂性反流病的临床研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2015.
- FENG J X. Clinical studies of the method of dredging Du meridian to guide Chi on non-erosive reflux disease (in Chinese) [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2015.
- [21] 袁浩森, 黄晓燕, 李建锋, 等. 从督脉论治胃食管反流病研究进展[J]. *山东中医杂志*, 2020, 39(9): 1012-1016.
- YUAN H S, HUANG X Y, LI J F, et al. Research progress in the treatment of gastroesophageal reflux disease based on governor vessel (in Chinese) [J]. *Shandong Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2020, 39(9): 1012-1016.
- [22] SHAH M K, DING Y, WAN J, et al. Electroacupuncture intervention of visceral hypersensitivity is involved in PAR-2 activation and CGRP-release in the spinal cord [J]. *Sci Rep*, 2020, 10: 11188.
- [23] 赵新胜, 买买提·依斯热依力, 克力木·阿不都热依木. 非糜烂性食管炎和内脏高敏感研究新进展[J]. *中华胃食管反流病电子杂志*, 2019, 6(4): 211-215.
- ZHAO X S, YISIREYILI M, ABUDUREYIMU K. The current resaerch on nonerosive reflux disease and visceral hypersensitivity (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Gastroesophageal Reflux Disease (Electronic Edition)*, 2019, 6(4): 211-215.
- [24] 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): 31(11): 98974.
- [25] TAHERIYAN F, TESHNEHLAB M, GHARIBZADEH S. Presenting a neuroid model of wind-up based on dynamic synapse [J]. *J Theor Biol*, 2019, 465: 45-50.
- [26] DELIVANOGLU N, BOZIKI M, THEOTOKIS P, et al. Spatio-temporal expression profile of NGF and the two-receptor system, TrkA and p75NTR, in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 41.
- [27] 杨易陈, 周子娴, 薛婷, 等. 电针对腹泻型肠易激综合征大鼠内脏敏感性及其结肠 NGF、TrkA、TRPV1 表达的影响[J]. *中国针灸*, 2022, 42(12): 1395-1402.
- YANG Y C, ZHOU Z X, XUE T, et al. Effect of electroacupuncture on visceral sensitivity and colonic NGF, TrkA, TRPV1 expression in IBS-D rats (in Chinese) [J]. *Chinese Acupuncture & Moxibustion*, 2022, 42(12): 1395-1402.
- [28] 金舒文, 刘伟, 刘嘉宝, 等. 基于 NGF/TrkA/TRPV1 通路探讨电针改善功能性消化不良大鼠胃高敏感性[J]. *实用医学杂志*, 2023, 39(22): 2928-2933.
- JIN S W, LIU W, LIU J B, et al. Mechanism of electroacupuncture for gastric hypersensitivity in functional dyspepsia rats rats through NGF/TrkA/TRPV1 pathway (in Chinese) [J]. *The Journal of Practical Medicine*, 2023, 39(22): 2928-2933.
- [29] MARDONES M D, JORQUERA P V, HERRERA-SOTO A, et al. PSD95 regulates morphological development of adult-born granule neurons in the mouse hippocampus [J]. *J Chem Neuroanat*, 2019, 98: 117-123.
- [30] TAYLOR B K, SINHA G P, DONAHUE R R, et al. Opioid receptors inhibit the spinal AMPA receptor Ca²⁺ permeability that mediates latent pain sensitization [J]. *Exp Neurol*, 2019, 314: 58-66.