

疏肝健脾方对小鼠脊髓背跟神经元 TRPV1 电流通道及 p-TRPV1、SP、CGRP 受体表达的影响

张涛¹ 邱燕婷¹ 徐卓妮¹ 陈小芬¹ 潘锋²

(1. 广西中医药大学附属瑞康医院消化科, 广西 南宁 530011; 2. 浙江省中西医结合医院消化科, 浙江 杭州 330011)

摘要: **目的** 探讨疏肝健脾方对小鼠脊髓背跟神经元香草酸受体亚型 1 (the transient receptor potential vanilloid type 1, TRPV1) 电流通道及 p-TRPV1、物质 P (SP)、降钙素基因相关肽 (CGRP) 受体表达的影响。 **方法** 参照血清药理学方法, 正常组及疏肝健脾方低、中、高剂量组含药血清; 分离并原代培养 C57 小鼠脊神经后角神经节 (Dorsal root ganglion, DRG) 细胞, 通过免疫荧光法进行细胞鉴定, DRG 细胞经辣椒素 (Capsaicin, CAP) 干预后分组 (即低、中、高剂量组) 予含药血清干预, 利用全细胞膜片钳技术记录的 DRG 细胞 TRPV1 通道电流; 采用 RT-PCR 及 Western-blot 检测小鼠 DRG 神经元中 p-TRPV1、SP、CGRP 表达变化。 **结果** 经细胞鉴定, 证实成功分离小鼠 DRG 细胞; DRG 细胞形态呈圆形, 胞体较小, 突起较长; 结肠平滑肌细胞形态细胞形状椭圆形, 束状排列, 密集与稀疏处相互交错呈“峰谷”状。疏肝健脾方无法直接激活 DRG 神经元中的 p-TRPV1 通道, 却可正向调控辣椒素激发的 p-TRPV1 电流; 低、中、高剂量组 DRG 细胞内 p-TRPV1、CGRP 的 mRNA 及蛋白表达量随药物浓度增高逐步下降 ($P < 0.05$), SP 表达 mRNA 及蛋白表达量随药物浓度增高逐步上升 ($P < 0.05$)。 **结论** 疏肝健脾方可通过下调 p-TRPV1 表达, 从而抑制 CGRP 的表达, 上调 SP 表达, 发挥防治肠易激综合征 (Irritable Bowel Syndrome, IBS) 的效用。

关键词: 疏肝健脾方; p-TRPV1; SP; CGRP; 肠易激综合征

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1673-7717(2020)02-0072-07

Effects of *Shugan Jianpi* Recipe on TRPV1 Current Channel and Expressions of p-TRPV1, SP and CGRP Receptors in Spinal Dorsal Horn Neurons of Mice

ZHANG TAO¹, QIU YANTING¹, XU ZHUONI¹, CHEN XIAOFEN¹, PAN FENG²

(1. Department of Gastroenterology, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530011, Guangxi, China;

2. Department of Gastroenterology, Zhejiang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hangzhou 330011, Zhejiang, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of *Shugan Jianpi* Recipe on the expressions of TRPV1 current channel and p-TRPV1, SP and CGRP receptors in spinal cord heel neurons of mice. **Methods** According to the serum pharmacology method, there were normal group and drug-containing serum of *Shugan Jianpi* Recipe low, medium and high dose groups. We isolated and primarily cultured C57 mice DRG (dorsal root ganglion) cells. By immunofluorescence cell identification, DRG cells were treated with Capsaicin (CAP) intervention (low, medium and high dose groups) with drug-containing serum intervention, and DRG1 (the transient receptor potential vanilloid type) was recorded by whole-cell patch clamp technique 1) channel current. RT-PCR and Western-blot were used to detect the expression changes of p-TRPV1, SP and CGRP in mouse DRG neurons. **Results** After cell identification, it was confirmed that mice DRG cells were successfully isolated. The morphology of DRG cells was round, the cell body was small, and the processes were long. The shape of colonic smooth muscle cells was elliptical, bundled and dense and sparse. *Shugan Jianpi* Recipe can not only directly activate p-TRPV1 channel in DRG neurons, but also positively regulate capsaicin-activated p-TRPV1 current. The mRNA and protein expressions of P-TRPV1 and CGRP in DRG cells of low, medium and high dose groups decreased gradually with the increase of drug concentration ($P < 0.05$), and the expressions of SP and mRNA increased gradually with the increase of drug concentration ($P < 0.05$). **Conclusion** *Shugan Jianpi* Recipe can inhibit the expression of CGRP and up-regulate the expression of SP by down-regulating the expression of p-TRPV1, and plays a role in the prevention and treatment of irritable bowel syndrome.

Keywords: *Shugan Jianpi* Recipe; p-TRPV1; SP; CGRP; irritable bowel syndrome

基金项目: 国家自然科学基金(81460724); 广西自然科学基金(2014GXNSFAA118212); 全国中医岐黄优秀人才项目(J20184832009)

作者简介: 张涛(1976-), 男, 江西井冈山人, 主任医师, 硕士研究生导师, 博士后, 研究方向: 中西医结合防治消化系统疾病。

疏肝健脾方的主要成分为炒陈皮、炒白芍、炒白术、炒防风、柴胡、炙甘草、炮姜,具有疏肝健脾、缓急止痛功效。课题组前期临床及基础研究表明,疏肝健脾方对腹泻型肠易激综合征(Diarrhea-type Irritable Bowel Syndrome, IBS-D)有确切疗效^[1-2],这可能与疏肝健脾方通过香草酸受体亚型1(the transient receptor potential vanilloid type 1, TRPV1)敏化,降低钙离子内流,从而调控降钙素基因相关肽(CGRP)和物质P(SP)释放,抑制其效应细胞受体促成神经源性炎症的过程,降低内脏敏感性,起到防治IBS-D的作用相关,但其具体机制有待进一步挖掘。本研究通过体外培养小鼠脊神经后角神经节(Dorsal root ganglion, DRG)细胞,应用疏肝健脾含药血清进行干预及膜片钳技术等方法探讨疏肝健脾方药作用机制。

1 材料

1.1 动物及分组

SD大鼠(雄性,180~220g)购自广西医科大学动物实验中心,实验动物生产许可证:SCXK(桂)2014-0002,动物合格证号:No.45000300000106。实验单位使用许可证编号:SCXK(桂)2010-0001。各组大鼠随机数字表法可分为正常组、低、中、高含药血清提取组,每组各12只。C57-BL/6小鼠(雄性,4周)购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2001-0003,合格证号:0060892。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂 抗体p-TRPV1(Abnova PAB8499) 抗体SP(武汉三鹰13839-1-AP) 抗体CGRP(CST #14959) TR-Izol(美国Invitrogen 15596-026) cDNA第一链合成试剂盒(美国Thermo Fisher K1622) Taq DNA Polymerase(美国Thermo Fisher EP0405) Agarose(西班牙Biowest 111860) NSE(ab79757,兔单抗,稀释比1:100) 免疫荧光二抗(羊抗兔-CY3,BA1032,稀释比例1:100) 25% Trypsin-EDTA(中国KGY001) 辣素(capsaicin,美国Sigma公司 Lot BCBR3675V) Niflumic acid(NFA,美国selleck公司 S3018)(中国KGP250) BCA蛋白含量检测试剂盒(中国KGA801) 一抗稀释液(中国KGP106) WB二抗稀释液(中国KGP107) WB抗体清除缓冲液(中国KGP110) ECL检测试剂盒(中国KGP1123) 内参一抗(GAPDH,中国KGAA002) 二抗(羊抗小鼠/兔 IgG-HRP,中国) 显影定影试剂(中国KGP116) 均来自江苏凯基生物技术股份有限公司。

1.2.2 仪器 倒置荧光显微镜(OLYMPUS, IX71) 激光共聚焦显微镜(LEICA TCS SPE) 台式低速离心机(中国上海医疗器械股份有限公司医疗设备厂 80-2) 振荡器(中国上海沪西分析仪器厂 WH-2) 立式压力锅(中国上海博讯, YXQ-LS-50) 电热鼓风干燥箱(中国上海圣欣, 101AS-3) 荧光定量PCR循环仪(中国中山达安 DA7600) 核酸电泳仪(中国北京六一 DYY-6B) Western电泳仪(美国BIO-RAD, 164-5051) 恒温水浴箱(中国常州国华电器有限公司, HH-4) 多用脱色摇床(中国江苏金坛市正基仪器厂, HY-4) 普通梯度PCR仪(美国ABI Veriti 96 well Thermal cycler) 流式细胞仪(美国Becton-Dickinson FACS Calibur)。

2 方法

2.1 含药血清制备

疏肝健脾方(炒陈皮12g,炒白芍12g,炒白术12g,炒防风12g,柴胡8g,炙甘草6g,炮姜6g)购于广西中医药大学附属瑞康医院。蒸馏水煎浓缩,制备成原生药含量1g/mL的药液,SD大鼠适应性喂养1周后,第1周末,开始灌胃,正常组予等剂量生理盐水;低剂量组、中剂量组、高剂量组分别按3、6、12倍的成人用剂量给药,即3.1.6.2.12.4g/(kg·d) 药物用蒸馏水配成浓度310、620、1240g/L,大鼠灌胃给药体积为4mL/100g,连续灌胃3d,每天2次,每12h1次(参照陈奇主编《中药药理研究方法学》)结束后通过腹主动脉采血,3000r/min离心后分离血清,而后热灭活处理,0.22μm微孔滤膜过滤除菌,4℃保存备用。

2.2 DRG神经分离及药物干预

取C57小鼠1只,脱颈处死。表面皮肤用75%酒精消毒后带入细胞间,剪取脊柱的前肢至后肢段(颈椎部和腰椎部)沿脊柱纵向剪开成两段,置于冰冷的PBS缓冲液(无Ca²⁺、Mg²⁺)中。去除脊柱中白色的脊髓及一层膜,暴露椎间孔中的背根神经节,挑出DRG神经节,剪除DRG上附着的神经纤维、结缔组织膜和血块。再将DRG剪碎为小块,将DRG组织块的悬液吸入15mL离心管,稍离心后吸去上清仅留下组织块,再加入准备好的酶溶液(College-nase:1mg/mL和Trypsin:0.25mg/mL,双酶消化)晃动离心管使组织散开,置于37℃培养箱中消化20~25min(注意:组织晃动散开后,将离心管斜躺于一个大Dish盖中,同时拧松离心管盖,保证消化环境的二氧化碳浓度和渗透压)。消化时间终止前5min时,将斜躺的离心管直立于培养箱中,令组织块沉于管底。消化时间到时,轻轻吸出上层清液,剩下的组织块用1mL含血清的培养液清洗两遍。将酶液洗净后,再加入1mL含血清的培养液,用玻璃滴管轻轻吹打组织6次至溶液混浊,用移液枪将肉眼明显可见的组织块吸出,剩下的细胞悬液收集到新的15mL离心管中,再向剩余的组织块中加入1mL含血清的培养液,滴管轻轻吹打两下,同样方法收集细胞悬液。再反复2~3次,共收集到约2.5mL细胞悬液。接种在细胞培养瓶,并置于37℃的CO₂培养箱中进行培养。将DRG细胞分为4组,每组6孔,具体干预方案:疏肝健脾方低剂量组:10%疏肝健脾含药血清;疏肝健脾方中剂量组:15%疏肝健脾含药血清;疏肝健脾方高剂量组:30%疏肝健脾含药血清;正常组:10%空白血清。

2.3 DRG神经元鉴定

显微镜观察小鼠DRG细胞形态、状态及免疫荧光鉴定 Hoechst、NSE、Merge染色后,应用倒置相差显微镜,在细胞计数板上对所获细胞进行常规计数,并镜下观察小鼠DRG细胞状态,运用免疫荧光对小鼠DRG细胞进行细胞鉴定。

2.4 膜片钳技术记录DRG神经元的TRPV1通道电流

在室温条件下,利用全细胞膜片钳技术记录分离的DRG神经元的TRPV1通道电流。膜片钳记录使用HEKA系统(Patch Master软件),EPC-10膜片钳放大器,玻璃电极电阻为2~4MΩ,采样频率为10kHz,滤波频率为2.9kHz。在得到全细胞记录后,细胞电位设为-60mV,给予

辣椒素(Capsaicin, CAP),记录单电位情况下的激动电流。检测实验中用到的CAP的母液浓度为10 mmol/L,当使用1 μmol/L CAP作为检测浓度时,先使用溶媒DMSO将母液稀释到1 mmol/L,之后用外液千倍稀释到检测浓度;以10%、15%、30%的疏肝健脾方含药血清灌流于DRG细胞外液中,观察DRG神经元内电流变化。

2.5 DRG神经元全细胞记录用外液与内液

见表1~表2。

表1 DRG神经元全细胞记录用外液

化学成分	分子量(g/mol)	浓度(mmol/L)	质量(g/L)
NaCl	58.44	140	8.1816
KCl	74.55	5	0.3728
CaCl ₂	110.99	2	0.2219
MgCl ₂	95.21	1	0.0952
Glucose	180.16	10	1.8000
HEPES	238.31	10	2.3831

注:用NaOH调节pH至7.4,渗透压调至300~310 mOsm,保存于4℃备用

表2 DRG神经元全细胞记录用内液

化学成分	分子量(g/mol)	浓度(mmol/L)	质量(g/L)
CsCl	168.36	140.0	23.5702
MgCl ₂	95.21	1.0	0.0952
CaCl ₂	110.99	0.1	0.0111
HEPES	238.31	10.0	2.3831
EGTA	380.35	5.0	1.9018

注:用CsOH调节pH至7.2,渗透压调至295~300 mOsm,保存于4℃备用

2.6 RT-PCR法检测DRG细胞p-TRPV1、SP、CGRP基因表达

RT-PCR法具体步骤:RNA提取,RNA浓度和纯度的测定,cDNA第一链合成(20 μL体系),引物MIX,引物序列如表3,上机。总蛋白的提取,BCA法蛋白浓度的测定,SDS-PAGE电泳、转膜、封闭、抗原抗体反应、显色。使用G:BOX chemiXR5成像、图像分析;使用Gel-Pro32软件对结果进行灰度分析。采用Real time PCR法检测基因表达,以GAPDH为内参基因,检测大鼠DRG细胞样品中的p-TRPV1、SP、CGRP、GAPDH基因的表达水平。见表3。

表3 p-TRPV1、SP、CGRP、GAPDH引物列表

因子	F	R	扩增片段(bp)
CGRP	F: GCATGGCCACTCTCACTGAA	R: GCTTAGATCTGGGCTGTCC	141
SP	F: GCTCTGTATGTGGCAGAAGC	R: TGCACCTTGATACCAGCGACA	98
p-TRPV1	F: AGGGAGATCCATGAACCCGA	R: AGGTGCTCAATGCAGGACAGG	106
GAPDH	F: AGGGCTGCCCTCTCTGTGA	R: AACTTGCCGTGGGTAGACTCA	110

2.7 Western Blotting法检测DRG细胞p-TRPV1、SP、CGRP、GAPDH蛋白表达

Western Blotting检测具体步骤:细胞中加入裂解液,用枪头反复吹打后在冰浴中震荡,细胞充分裂解后,离心,留取上清液即为原始总蛋白。以GAPDH为内参,根据BCA法测定蛋白浓度。应用SDS-PAGE法制成电泳凝胶,蛋白上样,分离,转膜,封闭,孵育,显色。使用G:BOX chemiXR5成像,图像分析使用Gel-Pro32软件对结果进行灰度

分析。

2.8 统计学方法

数据采集分析处理采用pClamp10, GraphPad Prism 5和Excel软件,所有数据均以平均值±标准误($\bar{x} \pm s$)表示。应用SPSS 22.0统计软件分析处理各组数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,不符合正态分布及方差齐性的采用秩和检验。以P < 0.05为差异有统计学意义。

3 结果

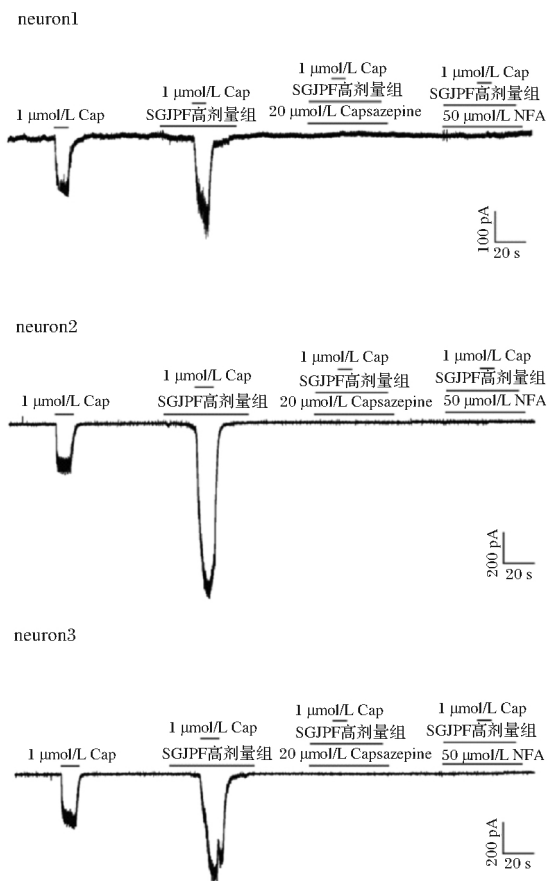
3.1 DRG细胞形态

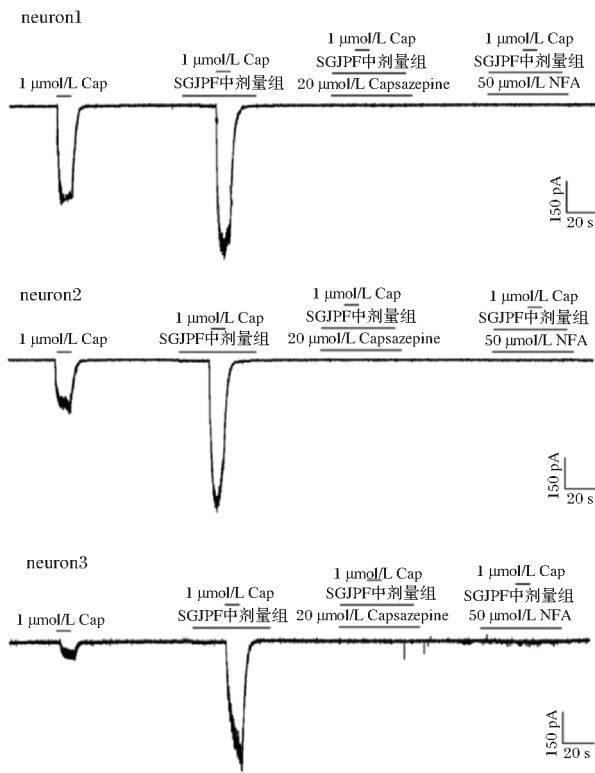
镜下可见DRG神经元形态呈圆形,胞体较小,突起较长,镜下折光性强,细胞核较大。背根神经节神经元的直径一般是20~80 μm,如插页VIII图1。

神经细胞表面标志神经特异性磷酸化酶(NSE)免疫荧光鉴定结果如插页VIII图2所示。

3.2 疏肝健脾方药对DRG细胞TRPV1通道电流的影响

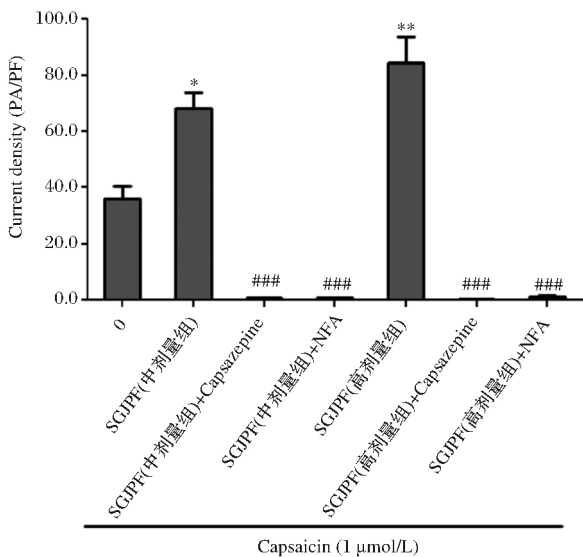
急性分离的DRG神经元经1 μmol/L CAP激动以确证此DRG神经元是否表达p-TRPV1通道。没有p-TRPV1电流的DRG神经元及时舍弃;有p-TRPV1电流的神经元按照图3的给药顺序处理,即1 μmol/L CAP—疏肝健脾方含药血清—20 μmol/L CAP; 1 μmol/L CAP—疏肝健脾方含药血清—50 μmol/L Niflumic acid(NFA),其电流密度统计如图4所示。经检测,疏肝健脾方虽然无法直接激活DRG神经元中的p-TRPV1通道,却可以正向调控辣椒素激动的p-TRPV1电流,低剂量组未检测出电流变化。





图上的横线表示给药持续的时间 给药刺激后 纵坐标的变化幅度表示电流的大小

图3 疏肝健脾方对 DRG 神经元中 p-TRPV1 通道电流的影响



与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

图4 疏肝健脾方给予前后 DRG 神经元中 p-TRPV1 的电流密度统计 ($\bar{x} \pm s$)

3.3 DRG 中 p-TRPV1、SP、CGRP、GAPDH 的 mRNA 及蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

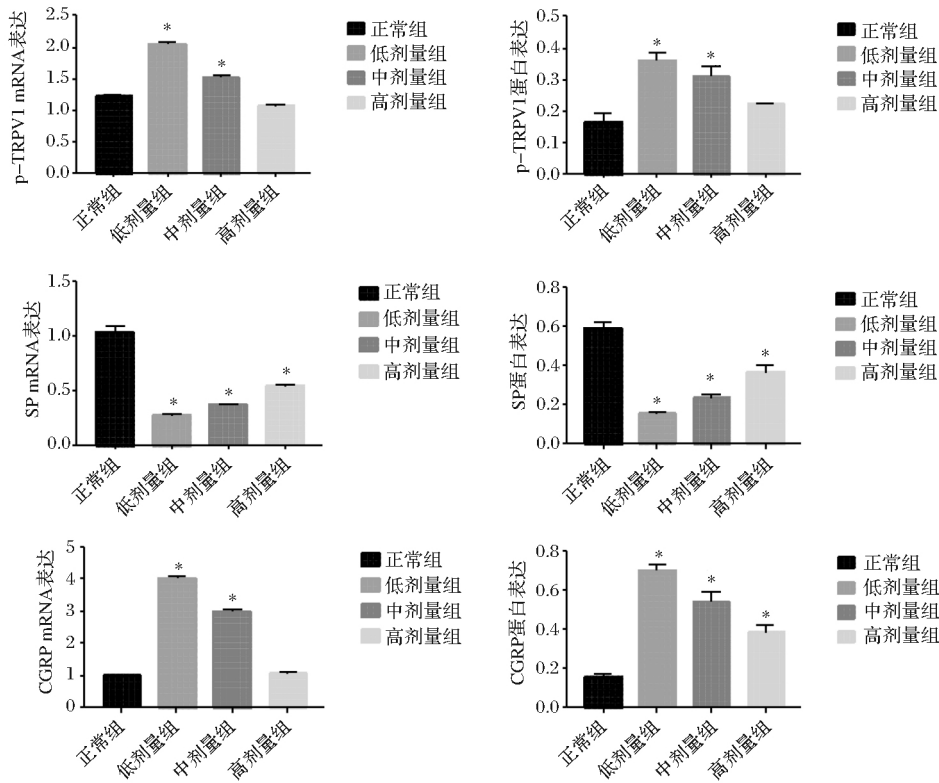
各中药组 DRG 神经元中 p-TRPV1、CGRP 的 mRNA 及蛋白表达量均高于正常组,低、中、高剂量组 DRG 细胞内 p-TRPV1、CGRP 的 mRNA 蛋白表达量随药物浓度增高逐步下降,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),与正常组相比高剂量组的 p-TRPV1 的 mRNA 及蛋白表达量,CGRP 的

mRNA 表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$),SP 各组 mRNA 及蛋白表达量均低于正常组,并随着浓度升高,表达量升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 5 ~ 图 6。

4 讨论

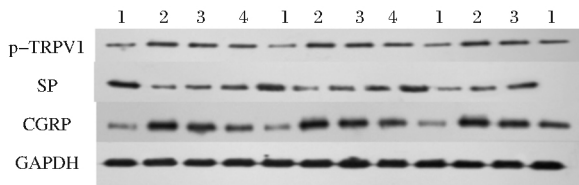
课题组通过多年临床经验及证候要素分析,发现 IBS-D 中医证型以肝脾不调最多见^[3],肝主疏泄,调情志,助脾胃运化,促进胆汁分泌;肝气郁结除有精神情志异常外,还常出现腹痛、腹泻等 IBS-D 常见的消化道症状。IBS-D 症状发作或加重与情绪紧张有关^[4],焦虑、抑郁、激动、恐惧等情绪不安因素刺激机体,引起胃肠运动功能改变及分泌功能的失调^[5]。所谓“痛责之于肝,泻责之于脾”,总的来说疏肝健脾当为 IBS-D 治疗大法。笔者以痛泻要方为基础,自拟疏肝健脾方,具有疏肝健脾、缓急止痛功效,临床应用有效,在体实验部分证实疏肝健脾方可能通过 PKA 依赖 cAMP 信号介导 TRPV1 靶点发挥治疗效用^[6-7]。IBS 的内脏痛觉传递是复杂的生理过程,其中脑-肠互动^[8]、DRG 神经元^[9]以及胃肠肽类物质神经递质^[10]在这个进程中具有神经环路作用。中枢神经系统与肠道(脑-肠轴,BGA)的双向相互作用的改变在 IBS 病理生理学中起重要作用^[11-12]。BGA 中的主要疼痛信号传导途径是脊髓丘脑束和背侧柱^[13],其具有源自延髓腹侧髓质的下行脊髓上传入^[14],其中 DRG 神经元属于初级感觉神经元,感受伤害性刺激、炎症刺激、温度觉等刺激产生冲动,在痛觉的产生和传导方面发挥重要作用^[15]。

本研究发现,疏肝健脾方可正向调控辣素激动后的 p-TRPV1 电流,显著抑制辣素激动后 DRG 中的 p-TRPV1 电流强度。p-TRPV1、CGRP 的 mRNA 蛋白表达量随药物浓度增高逐步下降,SP 各组 mRNA 及蛋白表达量均低于正常组,并随着浓度升高,表达量升高,CGRP 是痛觉传导相关的神经活性物质,富含于 DRG 中,SP 作为神经递质调节胃肠运动,同时还参与痛觉信息的传递,作为调节介质和神经递质,CGRP 与 SP 协同作用于 DRG 参与内脏超敏反应^[16-17]。TRPV1 是一种钙渗透性离子通道,DRG 神经元中广泛表达^[18],其负责转导某些化学物质(辣椒素、酸和热)活化,蛋白激酶 A (PKA) 和蛋白激酶 C (PKC) 在 TRPV1 磷酸化 (p-TRPV1) 中表现出显著作用^[19],PKA 对 TRPV1 的磷酸化显著增加 CAP 或热刺激后的 TRPV1 活性,TRPV1 被激活后,通路活化,开放通道使 Ca^{2+} 由细胞外流入细胞内,导致感觉神经肽的局部释放,包括 CGRP 和 SP,其反过来激活其效应细胞受体并促成神经源性炎症的过程,提高内脏敏感性,参与 IBS 的发病机制^[20-21]。在炎症产生和痛觉传递过程中发挥关键作用。CAP 阳性神经元是伤害性神经元,感受伤害性刺激而使机体产生痛觉和保护^[22],p-TRPV1 是由有害热激活的代表性离子通道,CAP 受体即 p-TRPV1 通道活化介导机体的痛觉产生和痛觉敏感^[23-24]。在本研究中,CAP 干预后的 DRG 中钙离子内流,p-TRPV1 的基因及蛋白表达均随着药物浓度的升高而降低。由此可证实疏肝健脾方通过降低 TRPV1 敏化,抑制钙离子内流,减少神经肽的局部释放,减缓结肠平滑肌收缩,降低内脏敏感性,从而达到防治 IBS 的效用。由此推测 p-TRPV1 可能是疏肝健脾方治疗 IBS 的靶点。



与正常组比较, * $P < 0.05$

图5 DRG中p-TRPV1、SP、CGRP、GAPDH的mRNA及蛋白表达($\bar{x} \pm s$)



1. 正常对照组; 2. 低剂量组; 3. 中剂量组; 4. 高剂量组

图6 p-TRPV1、SP、CGRP、GAPDH电泳图

综上所述,我们推测疏肝健脾方通过降低TRPV1敏化水平,降低CGRP上调SP释放,抑制其效应细胞受体促成神经源性炎症的过程,降低内脏敏感性,起到防治IBS-D的作用。

参考文献

[1] 谢建群,郑昱,费晓燕,等. 疏肝饮治疗腹泻型肠易激综合征肝脾不和型临床研究[J]. 上海中医药大学学报, 2004, 18(4): 11-13.
 [2] 潘相学,谢建群. 疏肝饮治疗肠易激综合征的临床疗效观察[J]. 上海中医药大学学报, 2006, 20(4): 48-50.
 [3] 张涛,谢建群. 谢建群从肝脾论治肠易激综合征经验拾萃[J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(2): 17-18.
 [4] STASI C, BELLINI M, COSTA F, et al. Neuroendocrine markers and psychological features in patients with irritable bowel syndrome[J]. International Journal of Colorectal Disease, 2013, 28(9): 1203.
 [5] ZVOLENSKY M, JARDIN C, FARRIS SG, et al. Gut interpretations: how difficulties in emotion regulation may help explain the relation of visceral sensitivity with depression and anxiety among young adults with gastrointestinal symptoms[J]. Psychol-

ogy, Health & Medicine, 2018(1): 1-6.
 [6] 方健松,马媛萍,刘畅,等. PKA调控TRPV1敏化介导CGRP表达探讨疏肝健脾方防治肠易激综合征研究[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(3): 601-604.
 [7] 马媛萍,黄晓燕,陈远能,等. PKA依赖cAMP信号介导SP调节内脏敏感性及疏肝健脾方防治肠易激综合征研究[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(1): 180-183.
 [8] BHATTARAI Y. Microbiota - gut - brain axis: Interaction of gut microbes and their metabolites with host epithelial barriers[J]. Neurogastroenterology & Motility the Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society, 2018, 30(6): e13366.
 [9] BUHNER S, BRASK B, LI Q, et al. Neuronal activation by mucosal biopsy supernatants from irritable bowel syndrome patients is linked to visceral sensitivity[J]. Experimental Physiology, 2015, 99(10): 1299-1311.
 [10] DE RC, MESSLINGER K, HOFFMANN T. Differential conduction and CGRP release in visceral versus cutaneous peripheral nerves in the mouse[J]. Journal of Neuroscience Research, 2018, 96(8): 1398-1405.
 [11] THEODOROU V, AIT BELGNAOUI A, AGOSTINI S, et al. Effect of commensals and probiotics on visceral sensitivity and pain in irritable bowel syndrome[J]. Gut Microbes, 2014, 5(3): 430-629.
 [12] GREENWOODVAN MEERVELD B, JOHNSON AC. Mechanisms of Stress - induced Visceral Pain[J]. Journal of Neurogastroenterology & Motility, 2018, 24(1): 7-18.
 [13] MARTIN CR, OSADCHYI V, KALANI A, et al. The Brain - Gut - Microbiome Axis[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2018, 6(2): 133-148.

姜树民治疗慢性萎缩性胃炎学术思想及经验

陈晨¹ 姜树民²

(1. 辽宁中医药大学 辽宁 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学附属医院 辽宁 沈阳 110032)

摘要:姜树民教授认为慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)的发生多与素体亏虚、外感六淫、饮食不节、情志失调等有关。发病之本主要为脾虚不运,湿热和瘀血为关键致病因素。基本病机概括为脾失健运,中焦湿热壅滞,枢机不利,脾胃升降失司。治疗以为健脾和胃,清热利湿为原则,疗效显著。

关键词:慢性萎缩性胃炎;学术思想;姜树民

中图分类号:R573.32

文献标志码:A

文章编号:1673-7717(2020)02-0077-04

JIANG Shumin's Academic Thought and Experience on Treating Chronic Atrophic Gastritis

CHEN Chen¹, JIANG Shumin²

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning, China;

2. The Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning, China)

Abstract: Prof. JIANG Shumin believes that the occurrence of this disease is related to the deficiency of the body, six exogenous, eating disorder, emotional disorder and so on. The main cause of the disease is spleen deficiency, heat and blood stasis as the key pathogenic factors. The basic pathogenesis is summarized as deficiency of spleen and physical activity, dampness and heat stagnation in the middle, unfavorable cardinal organs, and loss of Qi in the spleen and stomach. The treatment of strengthening spleen and stomach as well as clearing heat and dampness is the principle, and the

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)(2013CB532004)

作者简介:陈晨(1987-),男,吉林四平人,主治医师,博士研究生,研究方向:中医消化内科疾病。

通讯作者:姜树民(1957-),男,辽宁沈阳人,主任医师、教授,博士研究生导师,硕士,研究方向:中医消化内科疾病。

- [14] CHEN T, YOU Y, XIE G, et al. Strategy for an Association Study of the Intestinal Microbiome and Brain Metabolome Across the Lifespan of Rats [J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(4): 2475-2483.
- [15] MAO Y, LI Z, CHEN K, et al. Antinociceptive Effect of Ghrelin in a Rat Model of Irritable Bowel Syndrome Involves TRPV1/Opioid Systems [J]. *Cellular Physiology & Biochemistry International Journal of Experimental Cellular Physiology Biochemistry & Pharmacology*, 2017, 43(2): 518-530.
- [16] SUN J, WU X, MENG Y, et al. Electro-acupuncture decreases 5-HT, CGRP and increases NPY in the brain-gut axis in two rat models of Diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (D-IBS) [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 29(15): 340.
- [17] ZHANG YN, ZHAO HJ, WANG Y, et al. Effect of Electroacupuncture Intervention on Constipation-predominant Irritable Bowel Syndrome and Colonic CGRP and SP Expression in Rats [J]. *Zhen Ci Yan Jiu*, 2016, 41(1): 31-34.
- [18] ZHOU Q, YANG L, LARSON S, et al. Decreased miR-199 augments visceral pain in patients with IBS through translational upregulation of TRPV1 [J]. *Gut*, 2016, 65(5): 797-805.
- [19] WANG W, CAO X, LIU C, et al. Cannabinoid WIN 55 212-2 inhibits TRPV1 in trigeminal ganglion neurons via PKA and PKC pathways [J]. *Neuro Sci*, 2012, 33(1): 79-85.
- [20] STUEBER T, EBERHARDT MJ, CASPI Y, et al. Differential cytotoxicity and intracellular calcium-signalling following activation of the calcium-permeable ion channels TRPV1 and TRPA1 [J]. *Cell Calcium*, 2017, 68: 34-44.
- [21] TAKAISHI M, UCHIDA K, SUZUKI Y, et al. Reciprocal effects of capsaicin and menthol on thermosensation through regulated activities of TRPV1 and TRPM8 [J]. *Journal of Physiological Sciences*, 2016, 66(2): 143-155.
- [22] WOUTERS MM, BALEMANS D, WANROOY SV, et al. Histamine Receptor H1-Mediated Sensitization of TRPV1 Mediates Visceral Hypersensitivity and Symptoms in Patients With Irritable Bowel Syndrome [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(4): 875-887.
- [23] FENG Z, PEARCE LV, ZHANG Y, et al. Multi-Functional Diuretic Small Molecule Inhibitors of TRPV1 with Therapeutic Potential for Neuroinflammation [J]. *Aaps Journal*, 2016, 18(4): 898-913.
- [24] FENWICK AJ, FOWLER DK, WU SW, et al. Direct Anandamide Activation of TRPV1 Produces Divergent Calcium and Current Responses [J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2017, 10(21): 200.

疏肝健脾方对小鼠脊髓背跟神经元 TRPV1 电流通道 及 p-TRPV1、SP、CGRP 受体表达的影响

(正文见 72-77 页)

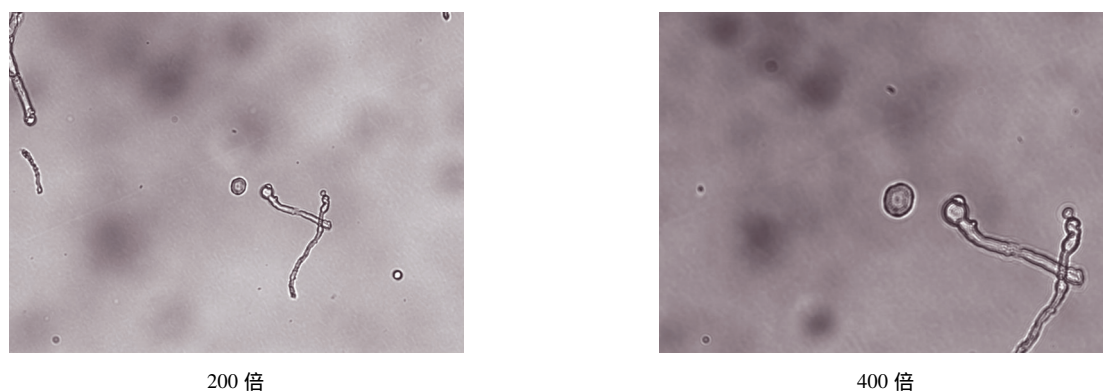
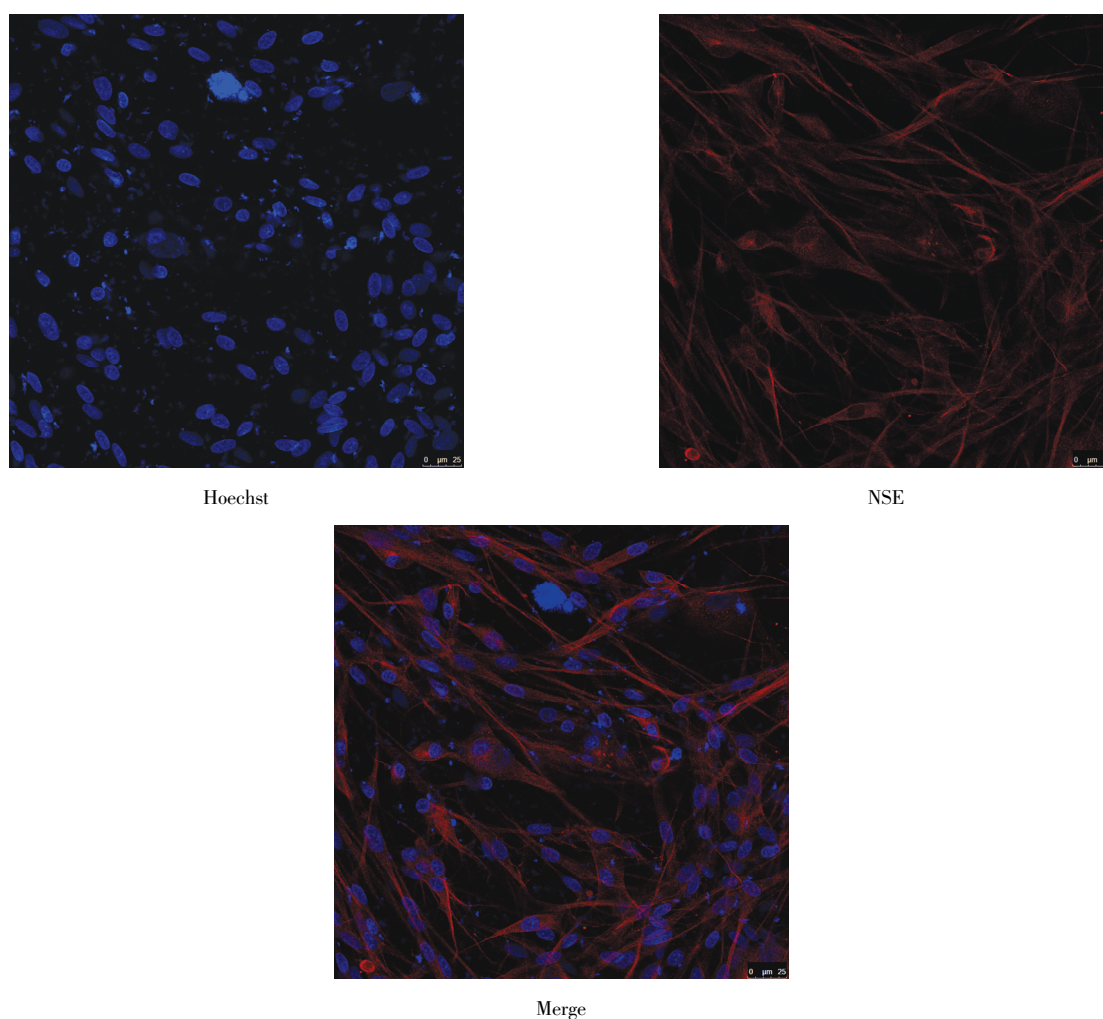


图1 DRG 细胞分离图片



图片中分离的 DRG 细胞与文献中报道相符合,证明分离的细胞为 DRG 细胞,可以用于后面的细胞实验

图2 DRG 细胞免疫荧光鉴定