

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research川陈皮素基于 AMPK/eNOS 信号通路通过下调
DRD2 改善大鼠慢传输型便秘的作用机制研究Research of mechanism of nobiletin improving slow transit constipation in rats by
downregulating DRD2 based on the AMPK/eNOS signaling pathway魏晓广, 王 权, 孙文娟,
李 敏, 程 玲(南阳市第一人民医院 消化内科, 河南 南阳
473000)WEI Xiao-guang, WANG Quan,
SUN Wen-juan, LI Min,
CHENG Ling(Department of Gastroenterology,
Nanyang First People's Hospital,
Nanyang 473000, Henan Province,
China)作者简介: 魏晓广(1981-), 男, 副主任中医师,
主要从事中西医结合消化病方面的
工作和研究通信作者: 王权, 副主任医师
MP: 15937772586

E-mail: 19913621706@163.com

摘要:目的 探讨川陈皮素(NO)通过多巴胺受体 D2(DRD2)对慢传输型便秘(STC)大鼠的作用及其机制。方法 70 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、低、中、高剂量实验组、AAV9-NC 组和 AAV9-DRD2 组, 每组 10 只。除空白组外, 各组均用 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 复方地芬诺酯灌胃建立 STC 模型。低、中、高剂量实验组分别用 $0.1, 0.2, 0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ NOB 灌胃, AAV9-NC 组和 AAV9-DRD2 组在中剂量实验组基础上分别给予尾静脉注射 AAV9-NC 和 AAV9-DRD2 $100 \mu\text{L}$ 。检测大鼠体质量和粪便指标, 用实时定量反转录聚合酶链式反应检测 DRD2 表达水平, 用酶联免疫吸附实验法检测血管活性肠肽(VIP)和一氧化氮(NO)水平, 用蛋白质印迹法检测腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/内皮型一氧化氮合酶(eNOS)信号通路相关蛋白水平。结果 空白组、模型组和低、中、高剂量实验组的粪便含水量分别为 $(35.24 \pm 5.25)\%$ 、 $(24.76 \pm 3.47)\%$ 、 $(28.38 \pm 2.77)\%$ 、 $(32.76 \pm 3.49)\%$ 和 $(33.32 \pm 4.34)\%$; 粪便数量分别为 (53.20 ± 5.25) 、 (42.40 ± 4.55) 、 (47.10 ± 5.36) 、 (49.50 ± 5.10) 和 (50.10 ± 5.04) 粒; 模型组与空白组比较, 低、中、高剂量实验组与模型组比较, 上述指标在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。DRD2 mRNA 的相对表达水平分别为 1.00 ± 0.12 、 2.95 ± 0.47 、 2.73 ± 0.49 、 2.17 ± 0.35 和 2.08 ± 0.32 , 中、高剂量实验组的 DRD2 mRNA 相对表达水平较模型组均显著降低(均 $P < 0.001$), 但 2 者比较在统计学上差异无统计学意义($P > 0.05$), 故选用中剂量实验组进行后续实验。空白组、模型组、中剂量实验组、AAV9-NC 组和 AAV9-DRD2 组 VIP 水平分别为 (43.15 ± 4.52) 、 (64.42 ± 7.64) 、 (51.68 ± 5.37) 、 (49.25 ± 4.44) 和 $(56.84 \pm 6.41) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, NO 水平分别为 (6.84 ± 0.71) 、 (11.68 ± 1.37) 、 (9.28 ± 0.93) 、 (9.35 ± 0.97) 和 $(10.45 \pm 1.03) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, AMPK 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 、 2.42 ± 0.34 、 1.68 ± 0.17 、 1.55 ± 0.18 和 1.94 ± 0.21 , eNOS 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.11 、 3.18 ± 0.35 、 2.28 ± 0.23 、 2.35 ± 0.27 和 2.95 ± 0.33 , 模型组与空白组比较, 中剂量实验组与模型组比较, AAV9-DRD2 组与 AAV9-NC 组比较, 上述指标在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 NOB 能够改善大鼠 STC, 可能是通过下调 DRD2 表达, 调节 VIP 和 NO 水平, 抑制 AMPK/eNOS 信号通路实现的。

关键词: 川陈皮素; 慢传输型便秘; 多巴胺受体 D2; 腺苷酸活化蛋白激酶/内皮型一氧化氮合酶; 血管活性肠肽

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.05.012

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2026)05-0664-07

Abstract: Objective To investigate the effects and mechanism of nobiletin (NOB) on slow transit constipation (STC) in rats through

dopamine receptor D2 (DRD2). **Methods** A total of 70 SD rats were randomly divided into blank group, model group, experimental - L, M, H group, AAV9 - NC group and AAV9 - DRD2 group, with 10 rats in each group. STC model was established with $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ compound diphenoxylate by intragastric administration except in blank group. In experimental - L, M, H group, $0.1, 0.2, 0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ NOB was administered intragastrically. On the basis of experimental - M group, AAV9 - NC group and AAV9 - DRD2 group were given AAV9 - NC and AAV9 - DRD2 $100 \mu\text{L}$, respectively. Weight and fecal indexes of rats were detected. The expression levels of DRD2 was detected by quantitative real time polymerase chain reaction. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and nitric oxide (NO) levels were detected by enzyme - linked immunosorbent assay. Levels of AMP - activated protein kinase (AMPK)/endothelial nitric oxide synthase (eNOS) signaling pathway related proteins were detected by Western blot. **Results** The fecal water content in blank, model, and experimental - L, M, H groups were $(35.24 \pm 5.25)\%$, $(24.76 \pm 3.47)\%$, $(28.38 \pm 2.77)\%$, $(32.76 \pm 3.49)\%$ and $(33.32 \pm 4.34)\%$, respectively; the fecal quantity were (53.20 ± 5.25) , (42.40 ± 4.55) , (47.10 ± 5.36) , (49.50 ± 5.10) and (50.10 ± 5.04) grains, respectively. Compared model group with blank group, and compared experimental - L, - M, - H groups with model group, the above indicators showed statistically significant differences ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). The relative expression levels of DRD2 mRNA in blank, model and experimental - L, M, H groups were 1.00 ± 0.12 , 2.95 ± 0.47 , 2.73 ± 0.49 , 2.17 ± 0.35 and 2.08 ± 0.32 , respectively. The relative expression levels of DRD2 mRNA in the experimental - M and experimental - H groups were significantly lower than those in the model group (all $P < 0.001$), with no significant difference between the two groups ($P > 0.05$); therefore, experimental - M was selected for subsequent experiments. The VIP levels of blank group, model group, experimental - M group, AAV9 - NC group and AAV9 - DRD2 group were (43.15 ± 4.52) , (64.42 ± 7.64) , (51.68 ± 5.37) , (49.25 ± 4.44) and $(56.84 \pm 6.41) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; NO levels were (6.84 ± 0.71) , (11.68 ± 1.37) , (9.28 ± 0.93) , (9.35 ± 0.97) and $(10.45 \pm 1.03) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; the relative expression levels of AMPK protein were 1.00 ± 0.15 , 2.42 ± 0.34 , 1.68 ± 0.17 , 1.55 ± 0.18 and 1.94 ± 0.21 , respectively; the relative expression levels of eNOS protein were 1.00 ± 0.11 , 3.18 ± 0.35 , 2.28 ± 0.23 , 2.35 ± 0.27 and 2.95 ± 0.33 , respectively. Compared model group with blank group, compared experimental - M group with model group, and compared AAV9 - DRD2 group with AAV9 - NC group, the above indicators all showed statistically significant differences (all $P < 0.05$). **Conclusion** NOB can improve STC in rats, possibly by down - regulating DRD2 expression, regulating VIP and NO levels, and inhibiting the AMPK/eNOS signaling pathway.

Key words: nobiletin; slow transit constipation; dopamine receptor D2; AMP - activated protein kinase/endothelial nitric oxide synthase; vasoactive intestinal peptide

慢传输型便秘(slow transit constipation,STC)作为临床上常见的一种以结肠传输延迟为主要特征的胃肠道疾病,可导致大便干燥、排便困难及排便次数减少等症状^[1-2]。STC的病理生理机制复杂,目前认为其核心环节涉及结肠动力障碍,具体包括肠道平滑肌萎缩与纤维化、肠神经系统神经元及神经递质失衡等^[3]。因此探索安全且疗效明确的STC干预手段成为目前关注的方向,近年来,越来越多的研究表明,中药成分在治疗STC方面具有独特优势^[4]。川陈皮素(nobiletin, NOB)作为柑橘类植物中富含的多甲氧基黄酮类化合物,展现出显著的抗炎、抗氧化效能^[5]。研究表明,NOB还具备促进肠道蠕动、缓解平滑肌痉挛以及增强胃肠道动力等生理功能,从而在改善排便功能及胃肠道健康

方面展现出潜在的应用价值^[6-7]。多巴胺受体 D2 (dopamine receptor D2, DRD2) 是 G 蛋白偶联受体家族成员,在胃肠道广泛表达,对胃肠道功能具有重要调节作用,研究发现,DRD2 信号通路与 STC 发病密切相关^[8]。腺苷酸活化蛋白激酶(AMP - activated protein kinase, AMPK)为调控能量代谢的关键因子,在调节代谢、胃肠动力因子的表达等方面起关键作用^[9]。内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)参与了胃肠动力性疾病的发病机制^[10]。已有研究表明,通过调控 AMPK/eNOS 通路可以参与 STC 发病机制^[11]。DRD2 作为 G 蛋白偶联受体,可以通过调节 AMPK 信号传导轴治疗肝变性^[12],提示 DRD2 与 AMPK/eNOS 通路之间存在潜在的调控网络。本研究旨在基于 AMPK/eNOS 信号通

路,探讨 NOB 通过调控 DRD2 表达对大鼠 STC 症状的作用,为 STC 的临床治疗提供新的思路和方法。

材料与方法

1 材料

动物 70 只 SD 雄性大鼠,体质量 210 ~ 230 g,鼠龄 8 周,购自郑州大学(河南省实验动物中心)。动物生产许可证号:SCXK(豫)2022-0001,动物使用许可证号:SYXK(豫)2021-0009。本实验经南阳市第一人民医院动物伦理委员会批准(伦理批号:2025-03-27)。

药品与试剂 NOB,规格:5 mg,纯度:≥97%,批号:MKCX1446,美国 Sigma-Aldrich 公司生产;复方地芬诺酯,规格:每片含盐酸地芬诺酯 2.5 mg、硫酸阿托品 25 μg,批号:220501,批准文号:国药准字 H4502008,广西河丰药业有限责任公司生产;SYBR Green One-Step 实时定量反转录聚合酶链式反应(quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒,上海碧云天生物技术股份有限公司生产;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒,辽宁沈阳万类生物科技有限公司生产;血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)试剂盒,上海晶风生物科技有限公司生产;一氧化氮(nitric oxide, NO)试剂盒,上海西唐生物科技有限公司生产;兔抗大鼠 AMPK、eNOS 和 β-肌动蛋白(beta-actin, β-actin)抗体,均由英国 Abcam 公司生产;AAV9-NC 和 AAV9-DRD2,均由上海汉恒生物科技有限公司生产。

仪器 CFX96 qRT-PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司产品;CX33 显微镜,日本 Olympus 公司产品;EnVision Nexus 酶标仪,瑞孚迪生物医学(上海)有限公司产品。

2 实验方法

2.1 模型构建^[13]

在为期 1 周的适应性饲养结束后,构建模型,造模方案为每日对大鼠予以 15 mg·kg⁻¹ 复方地芬诺酯灌胃处理,每日 1 次,连续 1 个月后构建 STC 模型。判定模型成功建立的标准为,与空白组相比,大鼠表现出体质量显著下降,同时粪便含水量及 24 h 粪便粒数均明显减少。

2.2 动物分组与给药方法

造模成功的 60 只大鼠随机分为以下 6 组:模型组、低、中、高剂量实验组、AAV9-NC 组和 AAV9-DRD2 组,每组 10 只,另选 10 只正常大鼠作为空白组。NOB 先溶于二甲亚砜中,配制成高浓度储备液,用 0.9% 生理盐水稀释,现用现配,于 4℃ 避光保存不超过 24 h。低剂量实验组在模型组基础上,每天

分别按照 0.1 g·kg⁻¹ NOB 剂量灌胃 1 次,连续给药 14 d;中剂量实验组在模型组基础上每天分别按照 0.2 g·kg⁻¹ NOB 剂量灌胃 1 次,连续给药 14 d;高剂量实验组在模型组基础上每天分别按照 0.4 g·kg⁻¹ NOB 剂量灌胃 1 次,连续给药 14 d;AAV9-NC 组在中剂量实验组基础上隔天给予尾静脉注射 AAV9-NC 100 μL,持续 14 d;AAV9-DRD2 组在中剂量实验组基础上隔天给予尾静脉注射 AAV9-DRD2 (1×10¹¹ v. g.) 100 μL,持续 14 d;空白组和模型组灌胃等量的 0.9% 氯化钠溶液(sodium chloride solution, NaCl),每天 1 次,连续 14 d。

2.3 检测大鼠体质量和粪便指标^[14]

在给药的第 0、6、10、14 天,分别对各组大鼠的体质量进行测定。给药结束后,将大鼠单独置于金属笼中,连续 24 h 按每小时 1 次的频率收集粪便,记录粪便数量及质量。将收集到的样本放入 60℃ 干燥器内干燥 12 h,再按公式计算粪便含水量。粪便含水量=(湿重-干重)/湿重×100%。

2.4 qRT-PCR 法检测 DRD2、AMPK 和 eNOS mRNA 表达水平^[15]

取各组大鼠结肠组织样本,用 TRIzol 试剂分离总 RNA。取总 RNA 1 μg 通过逆转录试剂盒合成 cDNA,并扩增。内参为 β-actin,用 2^{-ΔΔC_t} 法计算各 mRNA 相对表达水平。DRD2 上游:5'-GGCCACACTGGTA-ATGCCGTGG-3',下游:5'-TGCTGATGGCAGACAG-GTTCAGG-3';AMPKα1 上游:5'-AGCCCACCTGAT-TCTTTTCTT-3',下游:5'-GCCATTTTGCTTTCCTTACAC-3';AMPKα2 上游:5'-TGGTGTTATCTTGTAT-GCTCT-3',下游:5'-TCATGCTCTCTTATGTCTTTG-3';eNOS 上游:5'-TGGTCAACTATTTCTGTCCCCG-3',下游:5'-TTGTCGCCTTCACTCGCTTCG-3';β-actin 上游:5'-CCTTCCTGGGCATGGAGTC-3',下游:5'-TGATCTTCATTGTGCTGGGTG-3'。

2.5 HE 染色法检测结肠组织病理情况^[16]

麻醉处死大鼠并取结肠中段约 1 cm 组织样本,经预冷生理盐水充分漂洗,立即置于 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h,随后进行常规石蜡包埋处理。制备切片,脱蜡水洗后染色。用苏木精和伊红染液染色,染色后的切片经脱水、透明、封片处理,最后于光学显微镜下对组织形态进行观察,并采集相应的病理图像用于后续分析。

2.6 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法检测 VIP 和 NO 水平^[17]

取大鼠部分结肠组织研磨匀浆,匀浆液以

8 000 r · min⁻¹离心 10 min, 取上清液。按各 ELISA 试剂盒说明书步骤检测 VIP 和 NO 水平。

2.7 蛋白质印迹法检测 AMPK/eNOS 信号通路相关蛋白水平^[18]

收集大鼠结肠组织匀浆裂解, 经 1.2×10^4 r · min⁻¹离心处理后, 收集上清液备用。用试剂盒对蛋白含量进行定量检测, 取等量蛋白样品进行电泳分离, 随后完成转膜操作。将膜置于 5% 脱脂奶粉溶液中, 室温下振荡封闭 2 h, 再加入稀释后的一抗, 在 4 ℃ 条件下孵育过夜。次日, 用洗涤液洗膜 3 次, 加入二抗在室温下孵育 2 h, 通过化学发光法进行显影, 最后用 Image J 软件对蛋白条带的灰度值进行定量分析。

3 统计学处理

本研究用 SPSS 24.0 软件进行数据的统计分析, 符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较用方差分析 (ANOVA) 检验, 进一步两两比较用 *LSD-t* 检验。

结 果

1 NOB 对 STC 大鼠体质量和粪便指标的影响

与空白组比较, 模型组大鼠第 6、10 和 14 天的体质量均显著降低; 与模型组比较, 低、中、高剂量实验

组大鼠第 6、10 和 14 天的体质量均显著增加 (均 $P < 0.001$), 且与剂量呈正比, 见表 1。与空白组比较, 模型组大鼠的粪便湿重、干重、含水量和粪便数量均显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.001$); 除低剂量实验组大鼠的粪便干重外, 与模型组比较, 中、高剂量实验组大鼠的粪便干重以及低、中、高剂量实验组大鼠的粪便湿重、含水量和粪便数量均显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), 见表 2。

2 NOB 对 STC 大鼠结肠组织中 DRD2 表达的影响

空白组、模型组和低、中、高剂量实验组 DRD2 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.12 、 2.95 ± 0.47 、 2.73 ± 0.49 、 2.17 ± 0.35 和 2.08 ± 0.32 。与空白组相比, 模型组大鼠结肠组织中 DRD2 mRNA 相对表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 中、高剂量实验组大鼠结肠组织中 DRD2 mRNA 相对表达水平均显著降低 (均 $P < 0.001$); 与低剂量实验组相比, 中、高剂量实验组大鼠结肠组织中 DRD2 mRNA 相对表达水平均显著降低 (均 $P < 0.01$); 中、高剂量实验组之间在统计学上差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 故选用中剂量实验组进行后续实验。

3 NOB 调控 DRD2 对 STC 大鼠结肠组织病理学的影响

空白组结肠组织结构清晰, 黏膜上皮结构较好,

表 1 各组大鼠体质量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of body weight of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Weight (g)			
		0 days	6 days	10 days	14 days
Blank	10	215.62 ± 3.32	222.83 ± 3.09	226.24 ± 4.35	233.25 ± 3.28
Model	10	214.48 ± 4.08	201.64 ± 3.17***	200.76 ± 3.47***	200.48 ± 4.08***
Experimental - L	10	215.04 ± 3.56	208.43 ± 3.41###	209.53 ± 3.15###	210.04 ± 3.56###
Experimental - M	10	214.76 ± 3.98	216.53 ± 3.57###&&	222.33 ± 3.36###&&	224.76 ± 3.98###&&
Experimental - H	10	214.57 ± 3.27	221.32 ± 3.14###&&▲▲	226.32 ± 4.44###&&▲	228.57 ± 3.27###&&▲

Blank group: 0.9% NaCl; Model group: 15 mg · kg⁻¹ compound diphenoxylate + 0.9% NaCl; Experimental - L, M, H group: 15 mg · kg⁻¹ compound diphenoxylate + 0.1, 0.2, 0.4 g · kg⁻¹ NOB; Compared with blank group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, ### $P < 0.001$; Compared with experimental - L group, && $P < 0.001$; Compared with experimental - M group, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$.

表 2 各组大鼠粪便指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of fecal and fecal indexes of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	Wet weight (g)	Dry weight (g)	Water content (%)	Fecal quantity (grains)
Blank	7.62 ± 0.92	4.93 ± 0.79	35.24 ± 5.25	53.20 ± 5.25
Model	5.73 ± 0.78***	4.31 ± 0.47*	24.76 ± 3.47***	42.40 ± 4.55***
Experimental - L	6.53 ± 0.66###	4.68 ± 0.51	28.38 ± 2.77#	47.10 ± 5.36#
Experimental - M	7.12 ± 0.72###	4.79 ± 0.50#	32.76 ± 3.49###&	49.50 ± 5.10##
Experimental - H	7.24 ± 0.74###&	4.82 ± 0.49#	33.32 ± 4.34###&	50.10 ± 5.04##

Dose and n refer to table 1; Compared with blank group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; Compared with experimental - L group, & $P < 0.05$, && $P < 0.01$.

细胞排列整齐均匀;相较于空白组,模型组结肠组织结构紊乱,肌层较薄;与模型组相比,中剂量实验组大鼠结肠组织结构逐渐清晰;与中剂量实验组相比, AAV9-NC 组大鼠结肠组织病理变化不明显;与 AAV9-NC 组相比, AAV9-DRD2 组大鼠结肠组织结构紊乱,黏膜破坏,见图 1。

4 NOB 调控 DRD2 对 STC 大鼠结肠组织中 VIP 和 NO 水平的影响

与空白组相比,模型组大鼠结肠组织中的 VIP 和 NO 水平均显著升高(均 $P < 0.001$);与模型组相比,中剂量实验组大鼠结肠组织中的 VIP 和 NO 水平均显著降低($P < 0.01$, $P < 0.001$);与中剂量实验组相比, AAV9-NC 组大鼠结肠组织中的 VIP 和 NO 水平在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);与 AAV9-NC 组相比, AAV9-DRD2 组大鼠结肠组织中的 VIP 和 NO 水平均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表 3。

5 NOB 对 STC 大鼠结肠组织中 AMPK/eNOS 蛋白表达水平的影响

与空白组相比,模型组大鼠结肠组织中的 AMPK、eNOS mRNA 和蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.001$);与模型组相比,中剂量实验组大鼠结肠组织中的 AMPK、eNOS mRNA 和蛋白相对表达水平

均显著降低(均 $P < 0.001$);与中剂量实验组相比, AAV9-NC 组大鼠结肠组织中的 AMPK、eNOS mRNA 和蛋白相对表达水平在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);与 AAV9-NC 组相比, AAV9-DRD2 组大鼠结肠组织中的 AMPK、eNOS mRNA 和蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.001$),见表 4 和图 2。

表 3 各组大鼠结肠组织中血管活性肠肽(VIP)和一氧化氮(NO)水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of vasoactive intestinal peptide (VIP) and nitric oxide (NO) levels of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	VIP (ng · L ⁻¹)	NO (μmol · L ⁻¹)
Blank	10	43.15 ± 4.52	6.84 ± 0.71
Model	10	64.42 ± 7.64 ***	11.68 ± 1.37 ***
Experimental - M	10	51.68 ± 5.37 ###	9.28 ± 0.93 ##
AAV9 - NC	10	49.25 ± 4.44	9.35 ± 0.97
AAV9 - DRD2	10	56.84 ± 6.41 △△	10.45 ± 1.03 △

Dose of blank, model and experimental - M groups refer to table 1; AAV9-NC group: 15 mg · kg⁻¹ compound diphenoxylate + 0.2 g · kg⁻¹ NOB + AAV9-NC 100 μL; AAV9-DRD2 group: 15 mg · kg⁻¹ compound diphenoxylate + 0.2 g · kg⁻¹ NOB + AAV9-DRD2 (1 × 10¹¹ v. g.) 100 μL; Compared with blank group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; Compared with AAV9-NC group, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$.

表 4 各组大鼠结肠组织中腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS) mRNA 和蛋白相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of mRNA and protein relative expression levels of AMP-activated protein kinase (AMPK) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in colon tissues of rats in all groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	mRNA		Protein	
	AMPK	eNOS	AMPK	eNOS
Blank	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.11
Model	2.38 ± 0.36 ***	3.13 ± 0.34 ***	2.42 ± 0.34 ***	3.18 ± 0.35 ***
Experimental - M	1.54 ± 0.16 ###	1.65 ± 0.18 ###	1.68 ± 0.17 ###	2.28 ± 0.23 ###
AAV9 - NC	1.61 ± 0.17	1.68 ± 0.21	1.55 ± 0.18	2.35 ± 0.27
AAV9 - DRD2	1.95 ± 0.20 △△△	2.15 ± 0.22 △△△	1.94 ± 0.21 △△△	2.95 ± 0.33 △△△

Compared with blank group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, ### $P < 0.001$; Compared with AAV9-NC group, △△△ $P < 0.001$.

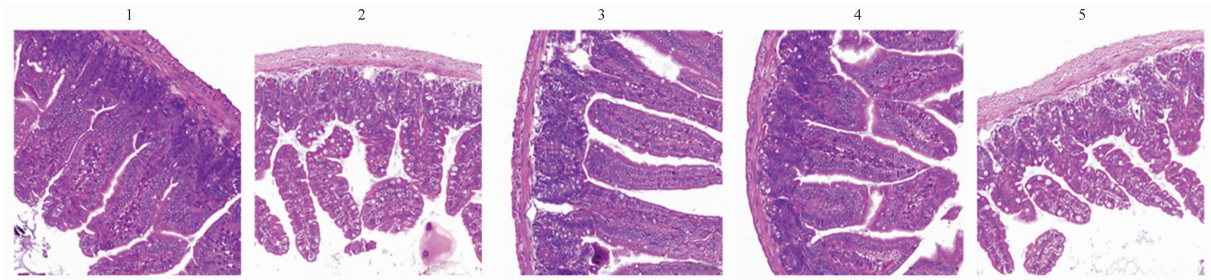


图 1 苏木精-伊红(HE)染色法检测各组大鼠结肠组织病理特征(×100)

Figure 1 Histopathological features of colon tissue in each group of rats by hematoxylin-eosin (HE) staining (×100)

1: Blank group; 2: Model group; 3: Experimental - M group; 4: AAV9-NC group; 5: AAV9-DRD2 group.

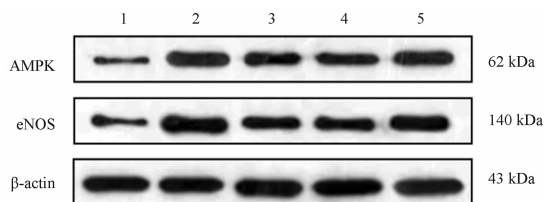


图2 蛋白质印迹法检测各组大鼠结肠组织中 AMPK 和 eNOS 蛋白相对表达水平

Figure 2 AMPK and eNOS protein relative expression levels in colon tissues of rats in each group detected by Western blot

1: Blank group; 2: Model group; 3: Experimental - M group; 4: AAV9 - NC group; 5: AAV9 - DRD2 group.

讨 论

STC 现行临床广泛应用的化学药物治疗方案普遍存在 2 方面局限,一方面可能引发药物耐受性及代谢紊乱等药物不良反应,另一方面易形成持续性泻剂依赖现象,致使临床疗效不稳定且复发率较高,这些问题显著降低患者生存质量^[19]。相较于传统化学药物,中医药干预通过多组分协同作用实现肠道功能的多靶点调控,在临床实践中不仅展现出稳定的通便效果,更在降低疾病复发率方面表现出独特优势^[20]。药理研究表明,枳实能够双向调节胃肠激素水平与平滑肌张力,显著增强肠道动力^[21]。陈皮活性成分 NOB 通过调控结肠肌电活动及神经递质传导,可以有效促进 STC 模型动物肠道推进功能^[22]。本研究发现,不同剂量 NOB 处理后大鼠体质量均增加。此外,中、高剂量实验组大鼠的粪便干重均显著增加,3 种剂量组大鼠粪便湿重、含水量和粪便数量均显著增加。研究提示,NOB 能够改善大鼠 STC。进一步分析显示,NOB 不仅促进了大鼠肠道内容的排出,还显著优化了粪便的物理性质,如增加干重和含水量,这可能与调节肠道水分吸收和分泌的功能有关。此外,NOB 各剂量组在改善 STC 大鼠体质量下降方面也表现出积极作用,暗示其可能通过改善肠道功能间接促进了营养吸收和整体健康状况^[23]。

DRD2 在调控胃肠道运动、消化道分泌以及胃肠道感觉等方面发挥关键作用。有研究^[24]指出,DRD2 在 STC 大鼠结肠组织中表达上调,提示 DRD2 激活可能通过抑制兴奋性神经传递参与 STC 发病,与本研究观察到的结果相符。且多巴胺能信号通过调节 cAMP - PKA 通路影响平滑肌收缩功能,DRD2 作为 G 蛋白偶联受体,其激活可以抑制腺苷酸环化酶活性,降低细胞内 cAMP 水平,从而导致平滑肌松弛^[25]。

本研究发现,模型组大鼠结肠组织中 DRD2 mRNA 的表达水平显著升高,不同剂量 NOB 处理后结果相反,提示 NOB 可能通过下调结肠组织中 DRD2 相对表达水平来发挥 STC 改善作用。进一步研究大鼠结肠组织病理学形态发现,模型组大鼠结肠组织结构紊乱,肌层较薄,而 NOB 处理后大鼠结肠组织结构逐渐清晰,过表达 DRD2 后大鼠结肠组织结构紊乱,黏膜破坏,提示 NOB 通过下调 DRD2 的相对表达水平,显著改善 STC 大鼠结肠组织的病理状态。NO 作为一种关键肠神经抑制递质,调控肠道动力,其激活会导致结肠蠕动减缓。研究发现,降低结肠组织 NO 含量,可以显著改善 STC 大鼠胃肠动力指标,提升小肠活性炭推进率,并减少肠黏膜腺体损伤^[26]。VIP 作为一种抑制性神经递质,在调控胃肠动力方面起重要作用,它通过促进平滑肌舒张来调节胃肠道运动。VIP 水平上升会抑制胃肠黏膜分泌和平滑肌收缩,进而可能引发 STC^[27]。本研究发现,模型组大鼠结肠组织中的 VIP 和 NO 水平均显著升高,NOB 处理可以降低 2 者水平,而过表达 DRD2 后,VIP 和 NO 相对表达水平均升高。研究提示,NOB 可以通过下调结肠组织 DRD2 表达,调节 VIP 和 NO 水平,改善 STC。

AMPK 作为能量代谢调节的中枢,对生理代谢活动具有重要意义。eNOS/NO 信号通路是 AMPK 下游效应器,对胃肠道运动具有显著的抑制作用^[28]。研究表明,抑制 AMPK/eNOS 信号通路能够有效改善 STC 模型大鼠的便秘症状,提高肠道功能^[29-30]。本研究发现,NOB 处理表现出对 AMPK/eNOS 信号通路的抑制作用,而过表达 DRD2 后则表现出对该通路的激活。研究提示,NOB 能够通过下调结肠组织 DRD2 表达抑制 AMPK/eNOS 信号通路,降低抑制性神经递质 VIP 和 NO 的水平,改善结肠组织病理损伤,增加粪便排出量和含水量,最终发挥对 STC 大鼠的保护作用。但本研究仍存在一定局限性,仅本实验仅在转录水平检测了 DRD2 的表达变化,未通过 Western blot 或免疫组织化学在蛋白水平进行验证,无法完全排除转录后调控对 DRD2 蛋白表达的影响,且蛋白印迹仅检测了 AMPK/eNOS 通路关键分子的磷酸化水平,未同步检测 DRD2 蛋白表达,未能直接建立 DRD2 与 AMPK 通路的蛋白层面关联;机制验证方面,虽通过 AAV9 过表达 DRD2 进行了功能回复实验,但未用免疫共沉淀或邻近连接分析等技术验证 DRD2 与 AMPK 的直接相互作用,也未在细胞水平通过 DRD2 敲低或过表达联合 AMPK 抑制剂及激活剂干预进一步验证 DRD2 与 AMPK/eNOS 通路的直接调控作用;

此外,本研究仅在STC大鼠模型中进行验证,缺乏临床便秘患者结肠组织的佐证,川陈皮素的人体有效性和安全性有待后续小样本临床试验进一步验证。

本研究提示:川陈皮素通过下调结肠组织DRD2表达,抑制AMPK/eNOS信号通路激活,降低抑制性神经递质VIP和NO的水平,改善结肠组织病理损伤,增加粪便排出量和含水量,从而发挥改善大鼠STC的作用。这一发现为STC的临床治疗提供了新的潜在靶点和实验依据。

参考文献:

- [1] 司香环,李东娜,李宏佳,等. 白术对慢传输型便秘的药理作用及临床配伍应用研究现状[J]. 世界中医药,2023,18(21):3143—3148.
- [2] 胡露楠,何友成,刘启鸿,等. 基于肠道菌群学说探讨“肾为胃之关”在慢传输型便秘治疗中的理论内容[J]. 世界中医药,2024,19(23):3664—3668.
- [3] BHARUCHA A E, LACY B E. Mechanisms, evaluation, and management of chronic constipation[J]. *Gastroenterology*,2020,158(5):1232—1249.
- [4] 刘睿婷,樊薛津,金博文,等. 中药治疗不同证候慢传输型便秘的研究进展[J]. 中草药,2024,55(23):8269—8277.
- [5] 辛力,龚文慧,郭静英,等. 天然产物川陈皮素的成分差异及抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 中华中医药学刊,2025,43(1):191—195.
- [6] 周稼荣,刘毅,陈金鹏,等. 基于网络药理学的夏黄颗粒治疗阿片类药物所致便秘的作用机制研究[J]. 中草药,2020,51(23):6015—6022.
- [7] 夏婧,陈伟特. 基于SCF/C-kit信号通路探讨川陈皮素对慢性传输型便秘大鼠肠道蠕动的改善作用实验研究[J]. 陕西医学杂志,2025,54(12):1616—1621.
- [8] 邓文雯,何永恒. 白术七物颗粒对结肠慢传输便秘大鼠结肠组织多巴胺D2受体的影响[J]. 时珍国医国药,2017,28(7):1565—1566.
- [9] 万莹,曾毅,吕文亮,等. 柴胡皂苷D调控CaMKK β /AMPK信号通路介导ICCs细胞自噬的机制[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2024,26(6):1393—1402.
- [10] 赵冉冉,王梦薇,王启航,等. 半夏泻心汤含药血清对大鼠胃Cajal间质细胞凋亡相关蛋白表达及eNOS、NO分泌的影响[J]. 中医杂志,2021,62(10):893—897.
- [11] 李春桃,徐云柯,喻淋淋,等. 利胆宽肠颗粒对功能性便秘大鼠AMPK/eNOS信号通路的影响[J]. 中国医院药学杂志,2025,45(16):1811—1816,1822.
- [12] MA P, OU H, CAI J, et al. DRD2-mediated AMPK ubiquitination regulates the occurrence of hepatic steatosis[J/OL]. *Liver Int*,2025,45(4):e70053. 2025-03-07[2026-01-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40052721/>.
- [13] 陈泰宇,李敏,赵兵,等. 白头翁皂苷A对慢传输型便秘大鼠的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2023,39(7):1013—1017.
- [14] 刘颖,常有,李祥永,等. 槐黄丸对慢传输型便秘大鼠结肠神经递质及SCF/c-kit通路的影响[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2022,24(3):1048—1055.
- [15] 尹康,陈科力,刘焱文,等. 白术对慢传输型便秘小鼠短链脂肪酸和肠道屏障的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2024,30(6):66—74.
- [16] 张远哲,赵罗娜,简胜男,等. 3种方法建立阳虚型慢传输型便秘大鼠模型的比较研究[J]. 中国实验动物学报,2023,31(5):618—628.
- [17] 赵罗娜,杨元凤,黎豫川,等. 附子—肉桂调控结肠VIP/cAMP/PKA/AQP通路改善大鼠阳虚型慢传输型便秘[J]. 中国实验方剂学杂志,2023,29(21):103—113.
- [18] LI D, SI X, HUA Y, et al. Tongbian formula alleviates slow transit constipation by increasing intestinal butyric acid to activate the 5-HT signaling[J]. *Sci Rep*,2024,14(1):17951.
- [19] KHOSHBIN K, BUSCIGLIO I, BURTON D, et al. Expanding criteria for slow colonic transit in patients being evaluated for chronic constipation by scintigraphy[J/OL]. *Neurogastroenterol Motil*,2020,32(9):e13878. 2020-05-12[2026-01-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32394592/>.
- [20] 刘睿婷,樊薛津,金博文,等. 中药治疗不同证候慢传输型便秘的研究进展[J]. 中草药,2024,55(23):8269—8277.
- [21] 王煜姣,贾庆玲,郭丽坤,等. 枳实治疗功能性消化不良作用机制的网络药理学分析[J]. 中药新药与临床药理,2022,33(5):666—673.
- [22] 黄礼,韦祎,刘英莲. 川陈皮素对慢传输型便秘小鼠的治疗作用及机制研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2023,25(5):1736—1742.
- [23] 朱哲琴,魏堰珊,施敏,等. 枳术丸调控VIP、cAMP、PKA、AQP1对慢传输型便秘小鼠肠道水液代谢的影响[J]. 时珍国医国药,2024,35(10):2374—2380.
- [24] 张晓媛. 慢传输型便秘大鼠胃肠道多巴胺D2受体表达[D]. 安徽合肥:安徽医科大学,2015.
- [25] BEAULIEU J M, GAINETDINOV R R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors[J]. *Pharmacol Rev*,2011,63(1):182—217.
- [26] 乐音子,王晓鹏,甄曙光,等. 通便汤对慢传输型便秘大鼠结肠c-kit和MLCK表达的影响[J]. 安徽医科大学学报,2019,54(8):1215—1220.
- [27] 崔梦晓,孙瑜培,李晓峰,等. 不同频率电针“天枢”对慢传输型便秘大鼠结肠肌电及P物质、血管活性肠肽的影响[J]. 针刺研究,2022,47(8):710—714.
- [28] MESBAHZADEH B, MOODI N, HASSANZADEH-TAHERI M, et al. Therapeutic potential of tadalafil in acetic acid-induced gastric ulcer in rats: Mechanisms and outcomes[J]. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol*,2025,398(12):17723—17734.
- [29] 谢昌营,余绪超,葛巍,等. 麻元通便止痛汤调控AMPK/eNOS信号通路改善大鼠慢传输型便秘的作用机制[J]. 中国药房,2022,33(13):1617—1623.
- [30] WANG Y, WANG X, QIAN Y, et al. Naringenin attenuates slow-transit constipation by regulating the AMPK/mTOR/ULK1 signalling pathway: *In vivo and in vitro* studies[J/OL]. *Front Pharmacol*,2025,16:1550458. 2025-06-17[2026-01-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40599805/>.

(本文编辑:崔兰卿 收稿日期 2026-01-12)