

## 枳实及其有效成分柚皮苷预防术后肠粘连的作用机制分析

樊玉青<sup>1,2</sup>, 张婷兰<sup>1,2</sup>, 刘艳<sup>2</sup>, 陈畅<sup>2</sup>, 陈莎<sup>2</sup>, 姜金铸<sup>2</sup>, 程锦堂<sup>2</sup>, 刘安<sup>2</sup>, 郭丛<sup>2\*</sup>, 闫智勇<sup>1\*</sup>  
(1. 西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 研究枳实及柚皮苷对大鼠术后肠粘连的预防作用并探究其作用机制。方法: 采用大鼠盲肠刮擦模型研究枳实和柚皮苷对肠粘连的预防作用, 雄性SD大鼠造模后随机分为模型组、地塞米松磷酸钠组及枳实低、中、高剂量组(1.58、3.15、6.30 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 另设假手术组仅进行开腹处理, 给药7 d后用Nair法评估肠粘连情况, 采用苏木素-伊红(HE)染色观察盲肠组织病理形态, 免疫组化检测盲肠粘连组织中基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达; 同时, 雄性SD大鼠造模后随机分为模型组、地塞米松磷酸钠组及柚皮苷低、中、高剂量组(50、100、200 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 另设假手术组仅进行开腹处理。给药7 d后评估肠粘连情况, 采用HE染色观察盲肠组织病理形态, 免疫组化检测盲肠粘连组织中MMP-9的表达, 蛋白质免疫印迹法分析盲肠组织中转化生长因子-β<sub>1</sub>(TGF-β<sub>1</sub>)和α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的表达。结果: 枳实能抑制大鼠术后肠粘连的形成, 组织病理学结果显示, 其能减少受损盲肠组织中的炎性细胞浸润, 并呈剂量依赖性地上调黏附组织中MMP-9的表达; 柚皮苷各剂量组均能明显抑制大鼠术后肠粘连, 减少组织中炎性细胞浸润和纤维增生, 呈剂量依赖性地上调黏附组织中MMP-9的表达, 并能抑制盲肠组织中TGF-β<sub>1</sub>和α-SMA的表达。结论: 枳实及其有效成分柚皮苷均能有效预防术后肠粘连, 其作用可能与减轻组织纤维化和加速细胞外基质降解有关。

**[关键词]** 枳实; 柚皮苷; 肠粘连; 纤维化; 基质金属蛋白酶-9(MMP-9); 转化生长因子(TGF); α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)

**[中图分类号]** R22;R28;R96;R574.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)24-0050-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220452

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220419.0817.001.html>

**[网络出版日期]** 2022-04-20 12:49

### Investigation of Mechanism of Aurantii Fructus Immaturus and Naringin in Preventing Postoperative Intestinal Adhesion

FAN Yuqing<sup>1,2</sup>, ZHANG Tinglan<sup>1,2</sup>, LIU Yan<sup>2</sup>, CHEN Chang<sup>2</sup>, CHEN Sha<sup>2</sup>,  
JIANG Jinzhu<sup>2</sup>, CHENG Jintang<sup>2</sup>, LIU An<sup>2</sup>, GUO Cong<sup>2\*</sup>, YAN Zhiyong<sup>1\*</sup>

(1. School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China;  
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the preventive effect and mechanism of Aurantii Fructus Immaturus and naringin on postoperative intestinal adhesion in rats. **Method:** The preventive effect of Aurantii Fructus Immaturus and naringin on intestinal adhesion was studied by cecal scraping model of rats, the model rats were randomly divided into model group, dexamethasone sodium phosphate group and Aurantii Fructus Immaturus low, medium and high dose groups (1.58, 3.15, 6.30 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), sham-operated group was treated with an incision in the abdomen. Adhesion was assessed by Nair method after 7 d of administration. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological morphology and inflammatory cell infiltration of

**[收稿日期]** 2022-03-10

**[基金项目]** 国家重点研发计划项目(2019YFC1906601)

**[第一作者]** 樊玉青, 在读硕士, 从事中药药理学研究, E-mail: fanyuqing1024@163.com

**[通信作者]** \* 郭丛, 助理研究员, 从事中药药理学研究, E-mail: cguo@icmm.ac.cn;

\* 闫智勇, 教授, 从事中药药理学研究, E-mail: yzhiy@swjtu.edu.cn

cecum, the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in cecal adhesion was detected by immunohistochemistry. Meanwhile, intestinal adhesion model rats were randomly divided into model group, dexamethasone sodium phosphate group, naringin low, medium, high dose groups (50, 100, 200 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), and the sham-operated group was treated with an incision in the abdomen. Adhesion was assessed after 7 d of administration, HE staining was used to observe the pathological morphology and inflammatory cell infiltration in the cecum, and the expression of MMP-9 in the cecal adhesion tissue was detected by immunohistochemistry. Expressions of transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) in cecum were analyzed by western blot. **Result:** Aurantii Fructus Immaturus could inhibit the formation of postoperative intestinal adhesions in rats, reduce the inflammatory response of damaged cecum tissue, and up-regulate the expression of MMP-9 in the adherent tissue in a dose-dependent manner. All dose groups of naringin could significantly inhibit the formation of postoperative intestinal adhesions in rats, reduce inflammatory cell infiltration and fibrous proliferation in tissue, up-regulate the expression of MMP-9 in the adherent tissue in a dose-dependent manner, and inhibit the expression of TGF- $\beta_1$  and  $\alpha$ -SMA in cecal tissue. **Conclusion:** Aurantii Fructus Immaturus and naringin can reduce postoperative intestinal adhesion formation in rat model, and their effects may be related to reducing tissue fibrosis and accelerating extracellular matrix degradation.

**[Keywords]** Aurantii Fructus Immaturus; naringin; intestinal adhesion; fibrosis; matrix metalloproteinase-9 (MMP-9); transforming growth factor (TGF);  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)

肠粘连是由腹部手术中腹膜机械性损伤所致。据报道,腹部手术后的粘连发生率54%<sup>[1]</sup>,通常会引发多种并发症,如肠梗阻、肠胃胀气、不孕症、慢性腹痛和慢性盆腔痛等<sup>[2]</sup>。对于肠粘连的治疗和预防,目前主要包括二次手术、局部放置抗粘连生物材料、抗炎药物等,但二次手术会再次增加粘连的风险,生物材料副作用大且不易降解<sup>[3]</sup>,单一靶点的药物效果不明显,因此,找到一种疗效显著且能针对多个病理环节发挥作用的药物来防治术后肠粘连至关重要。

粘连形成的机制极为复杂<sup>[4]</sup>,外科手术中造成的出血会迅速启动机体的炎症反应和凝血级联反应,致使巨噬细胞、淋巴细胞、单核细胞、成纤维细胞、间皮细胞等大量增殖<sup>[5]</sup>,其中成纤维细胞、巨噬细胞和间皮细胞均会产生大量转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ),其是粘连形成过程中主要的促纤维化介质<sup>[6]</sup>,可介导组织纤维化和纤维瘢痕组织的生成,在各种纤维化疾病中高度表达<sup>[7-8]</sup>。同时,血浆中的大量纤维蛋白原渗出,TGF- $\beta_1$ 的高表达还会破坏纤溶系统的平衡并导致纤维蛋白沉积<sup>[9]</sup>,如果纤维蛋白不能及时溶解,成纤维细胞会产生大量胶原蛋白导致细胞外基质(ECM)的沉积,随后微血管逐渐生成,术后粘连的结构基础形成<sup>[10]</sup>。因此,现有的研究多以减轻炎症<sup>[11]</sup>、抗氧化应激<sup>[12-13]</sup>、维持纤溶系统平衡<sup>[14]</sup>、减少组织纤维化<sup>[15]</sup>、减少胶原蛋白沉积、降解ECM<sup>[16]</sup>及促进肠道动力等为切入点探索开发

预防术后肠粘连形成的药物和生物材料。

枳实为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* 及其栽培变种或甜橙 *C. sinensis* 的干燥幼果,常用于积滞内停、痞满胀痛、泻痢后重、大便不通、痰滞气阻、胸痹、结胸、脏器下垂<sup>[17]</sup>。其是经典名方大承气汤中主要的“峻下剂”,行气消积以治“痞”,大承气汤在临床常用于治疗术后肠梗阻<sup>[18-19]</sup>。枳实通降颗粒也能促进术后肠梗阻大鼠胃肠功能恢复<sup>[20]</sup>。此外,枳实还具有抗炎、抗菌、抗凝血、抗氧化<sup>[21]</sup>、促进肠胃蠕动<sup>[22]</sup>等药理作用。黄酮类成分是枳实理气行滞、祛痰消积的重要药效物质基础<sup>[23]</sup>,枳实中含量较高的黄酮类成分包括柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、忍冬苷等。柚皮苷作为枳实中主要的黄酮类化合物<sup>[24]</sup>,具有抗炎、抗氧化、抗血小板聚集<sup>[25]</sup>、促进胃肠蠕动<sup>[26]</sup>、调节间质转化、抑制瘢痕组织成纤维细胞增殖、降低瘢痕组织纤维化程度等作用。通过分析已有的相关研究,枳实和柚皮苷有可能均对术后肠粘连形成有抑制作用,且可能通过多靶点、多途径的协同作用在抑制术后肠粘连形成的复杂病理过程中发挥重要作用。因此,本研究拟通过建立大鼠术后肠粘连模型,评价枳实及其有效成分柚皮苷对术后肠粘连的预防作用,通过检测盲肠组织中炎症因子浸润、TGF- $\beta_1$ 和 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)的表达,以及粘连组织中基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达,探讨其可能的作用机制,为临床预防术后肠粘连提供实验依据。

## 1 材料

TGL-16M型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),BSA124S-CW型电子分析天平(德国Sartorius公司),Synergy H1型全功能型酶标仪(美国BioTek公司),PowerPac型电泳仪(美国Bio-Rad公司),RM2016型病理切片机(德国徕卡公司),S210型全景扫描仪(滨淞光子有限公司)。

地塞米松磷酸钠注射液(北安市飞龙动物药厂,批号20190701),MMP-9抗体(英国Abcam公司,货号ab76003),TGF- $\beta_1$ 兔单克隆抗体和 $\alpha$ -SMA兔单克隆抗体(美国Cell Signaling Technology公司,货号分别为3709S、19245S), $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)小鼠单克隆抗体(苏州百远生物科技有限公司,货号AM1021B),山羊血清、辣根过氧化物酶标记抗兔免疫球蛋白G(IgG)聚合物(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号分别为PV-9001、SAP-9100),山羊抗兔血清IgG聚合物、蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号分别为A0408、P0006C),十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)制备试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号P1200),苏木素染液、伊红染液、柚皮苷(纯度 $\geq 95\%$ )(美国Sigma公司,货号分别为H9627-100G、E4382-25G、71162-25G);枳实饮片(北京仟草中药饮片有限公司,批号200708001),经中国中医科学院中药研究所何希荣主管中药师鉴定,符合2020年版《中华人民共和国药典》(一部)相关项下要求<sup>[17]</sup>,252 g枳实饮片加8倍量80%乙醇回流提取2次,每次1 h,过滤,合并滤液,减压浓缩至生药质量浓度为0.63 g·mL<sup>-1</sup>,备用。

120只SPF级健康雄性SD大鼠,体质量220~260 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证编号SCXK(京)2019-0010,使用许可证编号SYXK(京)2019-0003。在标准实验室条件下,将动物饲养在恒定的室温(22.6 $\pm$ 0.5)°C和相对湿度45%条件下,光照和黑暗周期均为12 h。本文涉及的动物实验经中国中医科学院中药研究所伦理委员会批准,伦理审查号2021B096。

## 2 方法

**2.1 大鼠术后肠粘连模型建立及给药** 采用盲肠刮擦法诱导大鼠形成肠粘连<sup>[8]</sup>。手术前禁食12 h,用1%戊巴比妥钠(3 mL·kg<sup>-1</sup>)腹腔麻醉动物,在下腹中部切开约2 cm的切口,取出盲肠,用手术刀刮擦整个盲肠浆膜,致盲肠布满点状出血,将盲肠置于其原始位置与受伤的腹壁完全接触,缝合腹部,

假手术组仅进行开腹处理。手术24 h后,将大鼠随机分为5组,每组10只,包括模型组(给予等量生理盐水,下同),地塞米松磷酸钠组(10 mg·kg<sup>-1</sup>,下同)及枳实低、中、高剂量组(1.58、3.15、6.30 g·kg<sup>-1</sup>),另设假手术组(仅进行开腹处理,给予等量生理盐水,下同)。柚皮苷预防肠粘连实验中将造模后大鼠随机分为5组,每组10只,包括模型组、地塞米松磷酸钠组,以及柚皮苷低、中、高剂量组(50、100、200 mg·kg<sup>-1</sup>),另设假手术组。除地塞米松磷酸钠组大鼠连续腹腔注射给药7 d外,其他组大鼠均连续灌胃7 d。

**2.2 粘连评分方法** 手术后7 d,按2.1方法将所有动物麻醉,腹部切反向U形切口以评估粘连。采用Nair法<sup>[27]</sup>对粘连程度进行评价。0级,完全无粘连;1级,内脏之间或内脏与腹壁之间有单条粘连带;2级,内脏之间或内脏与腹壁之间有2条粘连带;3级,内脏之间或内脏与腹壁之间有3条或3条以上粘连带;4级,内脏与腹壁直接粘连,不计粘连带的数量和范围。

**2.3 组织病理学检测** 用于组织病理学检查的盲肠样本用10%多聚甲醛固定,对组织样本进行脱水、切片和染色。评估愈合过程、炎症细胞反应和成纤维细胞活性。

**2.4 免疫组化(IHC)检测MMP-9蛋白表达** 手术后7 d,用10%多聚甲醛固定盲肠粘连样本,将组织包埋在石蜡中。室温下将内源性过氧化氢活性猝灭,山羊血清在室温下孵育20 min,切片与MMP-9抗体(1:200)于4°C培养过夜。在室温下用辣根过氧化物酶标记抗兔IgG聚合物孵育20 min。对切片进行染色,使用光学显微镜观察和扫描图像。运用ImageJ 1.8.0软件分析吸光度A,棕色区域视为阳性,染色强度计算为阳性区域表达率。

**2.5 蛋白质免疫印迹法检测TGF- $\beta_1$ 和 $\alpha$ -SMA蛋白表达** 大鼠盲肠组织用RIPA裂解缓冲液和蛋白酶抑制剂匀浆,于4°C、4 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min(离心半径10 cm),取上清液测定蛋白含量。使用SDS-PAGE分离总蛋白提取物,将蛋白质电转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,用5%脱脂牛奶封闭,PVDF膜在4°C下与TGF- $\beta_1$ 兔单克隆抗体、 $\alpha$ -SMA兔单克隆抗体和 $\beta$ -actin小鼠单克隆抗体(1:1 000)一起孵育过夜。将PVDF膜与二抗(1:1 000)在37°C温育1 h。通过凝胶图像处理系统扫描、半定量分析。

**2.6 统计学分析** 实验数据采用SPSS 26.0软件进行分析,数据表示方式为 $\bar{x}\pm s$ ,组间比较采用单因素

方差分析;粘连程度分级评分进行秩和检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 枳实对大鼠术后肠粘连形成的抑制作用** 给药7 d后,采用Nair法对大鼠的肠粘连进行评分,见表1。结果发现假手术组未出现粘连,与假手术比较,模型组大鼠评分显著升高( $P < 0.01$ ),表明模型建立成功;模型组大鼠均出现粘连且粘连程度普遍偏高,与模型组比较,地塞米松磷酸钠组可显著抑制粘连( $P < 0.01$ )。与模型组比较,枳实高、中、低剂量组粘连形成减少,且枳实高剂量组粘连评分明显降低( $P < 0.05$ ),粘连评分随给药剂量增加而降低。

表1 枳实对大鼠粘连评分的影响

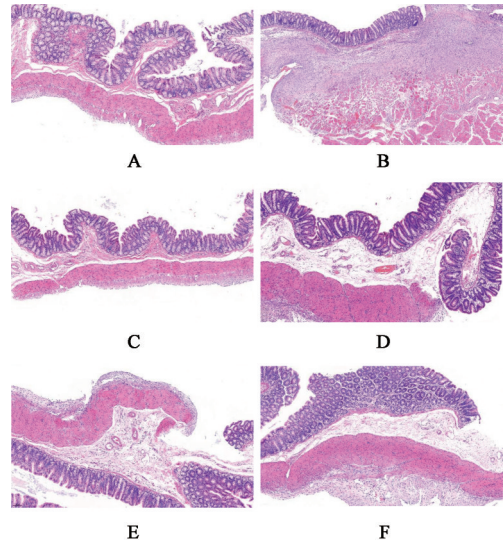
Table 1 Effect of Aurantii Fructus Immaturus on adhesion score in rats

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	大鼠数量/只					平均秩 (n=10)
		0级	1级	2级	3级	4级	
假手术组		10	-	-	-	-	14.00
模型组		-	1	1	4	4	47.35 <sup>2)</sup>
地塞米松磷酸钠组	0.01	9	1	-	-	-	15.75 <sup>4)</sup>
枳实低剂量组	1.58	1	3	1	3	2	39.40
枳实中剂量组	3.15	3	2	1	2	2	34.50
枳实高剂量组	6.30	4	1	2	1	2	32.00 <sup>3)</sup>

注:与假手术组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ (表2-表4同)

**3.2 枳实对大鼠盲肠组织病理学的影响** 利用苏木素-伊红(HE)染色观察组织病理情况及炎性细胞浸润情况,见图1。结果发现假手术组肠黏膜组织结构完整,无纤维化、无粘连、无炎性细胞浸润。模型组肠壁与腹壁肌肉组织粘连,浆膜剥离面未修复,有溃疡形成,肠壁纤维化显著,粘连组织内巨噬细胞增多,成纤维细胞增生活跃,大量胶原纤维致密排列,毛细血管增生明显。地塞米松磷酸钠组黏膜未见异常,无纤维化,极少数炎性细胞浸润。枳实低剂量组可见部分粘连组织中轻度纤维组织增生并伴有少量炎性细胞浸润。枳实中剂量组病变轻微,仅肠壁浆膜面小灶纤维化,与周围组织无粘连,少量炎性细胞浸润。枳实高剂量组仅肠壁浆膜表面有少量局灶性纤维化和少量炎性细胞浸润。表明不同剂量枳实均能有效减轻大鼠术后肠粘连组织中的炎症反应,减少肠壁组织纤维增生。

**3.3 枳实对大鼠盲肠粘连组织中MMP-9蛋白表达的影响** 大鼠盲肠粘连组织中MMP-9的表达情况见图2和表2。结果显示,假手术组和地塞米松磷酸



注:A.假手术组;B.模型组;C.地塞米松磷酸钠组;D.枳实低剂量组;E.枳实中剂量组;F.枳实高剂量组(图2同)

图1 枳实对大鼠盲肠组织病理学的影响(HE,×100)

Fig. 1 Effect of Aurantii Fructus Immaturus on histopathology of rat cecum (HE,×100)

钠组中MMP-9阳性表达极少。模型组中只有少量MMP-9表达,阳性着色极少。枳实低、中、高剂量组中MMP-9的阳性表达随给药剂量增加而增加,且与模型组比较差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明枳实能通过增加粘连组织中MMP-9的表达来加速ECM的降解,从而有效减少肠粘连的形成。

**3.4 柚皮苷对大鼠肠粘连形成的抑制作用** 采用Nair法对肠粘连情况进行评分,见表3。结果显示,假手术组均未出现粘连,与假手术组比较,模型组大鼠评分显著升高( $P < 0.01$ ),表明模型建立成功;与模型组比较,地塞米松磷酸钠组可明显抑制粘连,评分显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,柚皮苷各剂量组均能减少大鼠术后肠粘连的发生,粘连评分均明显降低( $P < 0.05$ )。

**3.5 柚皮苷对大鼠盲肠组织病理学的影响** HE染色结果显示,假手术组肠黏膜组织结构完整。模型组肠壁与腹壁肌肉组织粘连,局部肠黏膜脱落,有溃疡形成,肠壁纤维化显著,粘连组织内巨噬细胞增多,成纤维细胞增生活跃,细胞排列紊乱。地塞米松磷酸钠组肠黏膜组织结构完整,极少数炎性细胞浸润。柚皮苷低剂量组仅肠壁浆膜面局灶纤维化较明显,与肠壁无粘连,并伴有少量炎性细胞浸润。柚皮苷中剂量组仅肠壁浆膜面小灶纤维化,与周围无粘连,仅少量炎性细胞浸润且主要为淋巴细胞。柚皮苷高剂量组仅肠壁浆膜表面有少量局灶性纤维化和少量炎性细胞浸润。表明柚皮苷的各

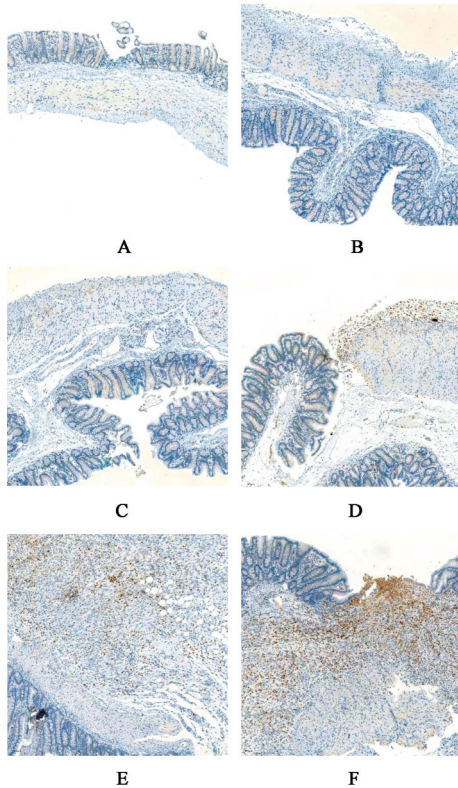


图2 枳实对大鼠术后盲肠粘连组织中MMP-9表达的影响(IHC, ×100)

Fig. 2 Effect of Aurantii Fructus Immaturus on expression of MMP-9 in rat cecum adherent tissue (IHC, ×100)

表2 枳实对大鼠术后盲肠粘连组织中MMP-9阳性表达率的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 2 Effect of Aurantii Fructus Immaturus on positive expression rate of MMP-9 in rat cecum adherent tissue ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

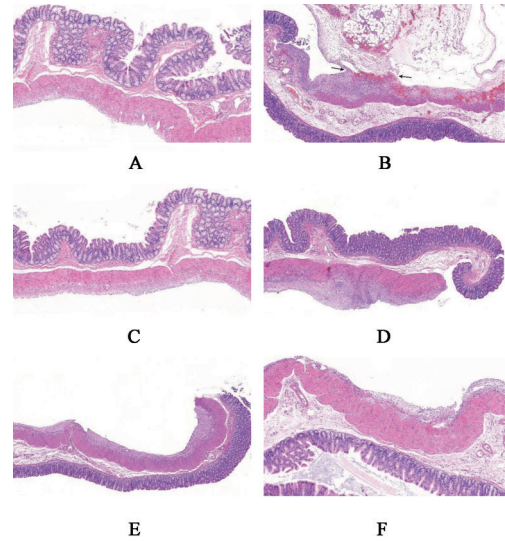
组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	MMP-9 阳性表达率/%
假手术组		0.23±0.06
模型组		0.57±0.29
地塞米松磷酸钠组	0.01	0.62±0.35
枳实低剂量组	1.58	1.02±0.21 <sup>3)</sup>
枳实中剂量组	3.15	1.91±0.49 <sup>3)</sup>
枳实高剂量组	6.30	2.61±0.87 <sup>3)</sup>

表3 柚皮苷对大鼠粘连评分的影响

Table 3 Effect of naringin on adhesion score in rats

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	大鼠数量/只					平均秩 (n=10)
		0级	1级	2级	3级	4级	
假手术组	10	-	-	-	-	-	13.00
模型组	-	1	1	4	4		51.60 <sup>2)</sup>
地塞米松磷酸钠组	0.01	8	2	-	-		14.95 <sup>4)</sup>
柚皮苷低剂量组	0.05	1	3	1	3	2	35.60 <sup>3)</sup>
柚皮苷中剂量组	0.10	3	2	1	2	2	34.80 <sup>3)</sup>
柚皮苷高剂量组	0.20	4	1	2	1	2	33.00 <sup>3)</sup>

剂量组均能有效减少大鼠术后盲肠粘连组织中炎性细胞浸润,减轻纤维组织增生情况。见图3。



注:A.假手术组;B.模型组;C.地塞米松磷酸钠组;D.柚皮苷低剂量组;E.柚皮苷中剂量组;F.柚皮苷高剂量组(图4-图5同)

图3 柚皮苷对大鼠盲肠组织病理学的影响(HE, ×100)

Fig. 3 Effect of naringin on histopathology of rat cecum (HE, ×100)

3.6 柚皮苷对盲肠组织中TGF-β<sub>1</sub>和α-SMA蛋白表达的影响 TGF-β<sub>1</sub>是纤维化的主要诱导因子,检测结果显示,与模型组比较,柚皮苷中、高剂量组和地塞米松磷酸钠组的TGF-β<sub>1</sub>表达均明显降低(P<0.05)。α-SMA是活化成纤维细胞的标志,与模型组比较,柚皮苷高剂量组中α-SMA蛋白表达明显降低(P<0.05)。说明柚皮苷能够通过降低TGF-β<sub>1</sub>和α-SMA的表达来减轻组织纤维化的程度,见图4和表4。

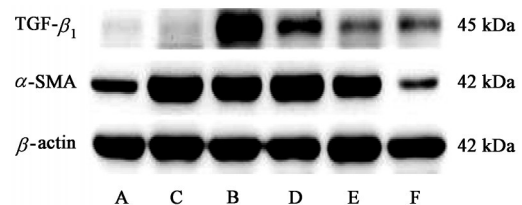


图4 柚皮苷作用后大鼠盲肠组织中TGF-β<sub>1</sub>和α-SMA蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of naringin on expressions of TGF-β<sub>1</sub> and α-SMA proteins in rat cecum tissue

3.7 柚皮苷对大鼠盲肠粘连组织中MMP-9表达的影响 利用IHC分析盲肠粘连组织中MMP-9的表达情况,见图5。结果发现假手术组和地塞米松磷酸钠组MMP-9表达极少;模型组可观察到少量MMP-9阳性着色;柚皮苷各剂量组的MMP-9阳性

表4 柚皮苷对大鼠盲肠粘连组织中MMP-9阳性表达率及盲肠组织中TGF-β<sub>1</sub>和α-SMA蛋白表达的影响(̄x±s)

Table 4 Effect of naringin on positive expression rate of MMP-9 and expressions of TGF-β<sub>1</sub> and α-SMA proteins in rat cecum adherent tissue (̄x±s)

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TGF-β <sub>1</sub> /β-actin(n=6)	α-SMA/β-actin(n=6)	MMP-9阳性表达率(n=5)/%
假手术组		0.25±0.02	0.36±0.07	0.20±0.13
模型组		0.85±0.17 <sup>2)</sup>	0.90±0.24 <sup>1)</sup>	0.42±0.34
地塞米松磷酸钠组	0.01	0.27±0.05 <sup>3)</sup>	0.67±0.17	0.31±0.26
柚皮苷低剂量组	0.05	0.70±0.06	0.70±0.26	7.33±0.61 <sup>3)</sup>
柚皮苷中剂量组	0.10	0.44±0.19 <sup>3)</sup>	0.54±0.10	8.45±1.29 <sup>4)</sup>
柚皮苷高剂量组	0.20	0.39±0.10 <sup>3)</sup>	0.31±0.12 <sup>3)</sup>	9.62±1.44 <sup>4)</sup>

表达均明显增多(P<0.05, P<0.01), MMP-9阳性表达率与给药剂量呈正相关,见表4。

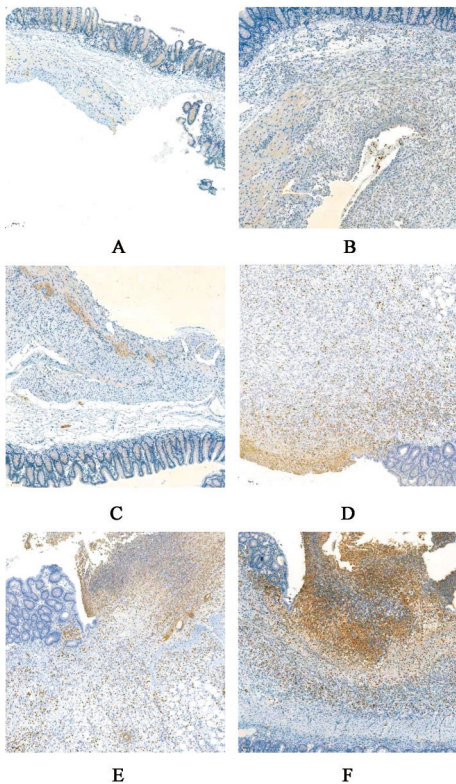


图5 柚皮苷对大鼠盲肠粘连组织中MMP-9表达的影响(IHC, ×100)

Fig. 5 Effect of naringin on expression of MMP-9 in rat cecum adherent tissue (IHC, ×100)

#### 4 讨论

肠粘连是一种常见的术后粘连综合征。目前可供临床使用的药物极少且疗效并不理想,不能满足复杂的肠粘连发病机制<sup>[3]</sup>。在中医理论指导下,中药防治术后肠粘连具有明显的特色和疗效。枳实含有丰富的生物活性成分,药理作用广泛,具有较强的理气作用,可促进胃肠道蠕动<sup>[28]</sup>,且在多种临床抗粘连药方中发挥重要作用<sup>[29-30]</sup>。其中黄酮类

成分在枳实中占比最高,占总量的5%~28%<sup>[31]</sup>,是枳实发挥理气作用的主要成分,因此,本文探究了枳实预防术后肠粘连的药效及作用机制,并对其中含量较高的黄酮类成分柚皮苷等进行抗肠粘连药效评价,结果发现枳实和柚皮苷均具有抗术后肠粘连的作用,可为术后肠粘连的防治提供口服药物选择。

炎症是术后肠粘连的重要成因,当盲肠壁受损时,炎症反应首先被激活,在炎症反应阶段,成纤维细胞、巨噬细胞和间皮细胞都会大量增殖,释放大量的炎症因子,从而导致组织纤维化,引起粘连<sup>[32-33]</sup>。在本研究中,组织病理结果显示,与模型组比较,枳实和柚皮苷干预后,炎性细胞浸润减少,间质细胞排列规则,成纤维细胞增生明显减少,毛细血管增生减少。说明枳实和柚皮苷可通过减轻机体炎症反应来抑制成纤维细胞增殖、抑制肠壁增生,从而减少粘连发生。

成纤维细胞在长期慢性损伤情况下会大量合成和分泌胶原蛋白,造成ECM过度沉积,形成粘连的结构基础。TGF-β<sub>1</sub>是这一过程中主要的促纤维化介质,会导致ECM和成纤维细胞的增加,是黏附形成过程的主要诱导剂<sup>[6]</sup>。α-SMA是活化成纤维细胞的标志,参与胶原蛋白、纤维连接蛋白和ECM的合成,是组织纤维化的经典指标。本文研究结果显示,随着柚皮苷给药剂量的增加,盲肠组织中TGF-β<sub>1</sub>的蛋白表达水平降低,高剂量的柚皮苷可明显降低盲肠组织中α-SMA的表达。MMP-9是ECM调控的关键因子,可以直接降解变性胶原、明胶等ECM分子<sup>[34-35]</sup>,其表达量在粘连组织中增加有助于ECM的降解,从而减少黏附<sup>[36-38]</sup>。本文研究结果显示,在粘连组织切片中,枳实和柚皮苷干预治疗后MMP-9的阳性表达率明显增加,并且与枳实比较,柚皮苷干预后MMP-9的阳性表达率更高。枳实在抑制ECM生成过程中作用不明显,但也能通过显著

增加MMP-9表达加速降解ECM,进而减少粘连。柚皮苷能通过减少ECM的生成和促进ECM的降解两方面来抑制ECM的沉积,从而达到减少粘连的目的。

综上所述,枳实可通过减少炎性细胞增殖和促进ECM成分降解来抑制大鼠盲肠刮擦引起的肠粘连的形成。其主要成分柚皮苷亦可明显抑制大鼠盲肠刮擦模型中肠粘连的形成,通过减轻炎症反应和组织纤维化程度,抑制ECM生成,以及促进ECM成分降解来发挥作用。本研究可为枳实和柚皮苷临床用于防治术后肠粘连提供一定的科学依据,但对其作用机制研究还有待深入。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] OKABAYASHI K, ASHRAFIAN H, ZACHARAKIS E, et al. Adhesions after abdominal surgery: A systematic review of the incidence, distribution and severity[J]. *Surg Today*, 2014, 44(3):405-420.
- [2] TABIBIAN N, SWEHLI E, BOYD A, et al. Abdominal adhesions: A practical review of an often overlooked entity[J]. *Ann Med Surg*, 2017, 15:9-13.
- [3] TANG J Y, XIANG Z Y, BERNARDS M T, et al. Peritoneal adhesions: Occurrence, prevention and experimental models [J]. *Acta Biomater*, 2020, 116: 84-104.
- [4] WARD B C, PANITCH A. Abdominal adhesions: Current and novel therapies[J]. *J Surg Res*, 2011, 165(1):91-111.
- [5] RODGERS K E, DIZEREGA G S. Function of peritoneal exudate cells after abdominal surgery[J]. *J Invest Surg*, 1993, 6(1):9-23.
- [6] LICHTMAN M K, OTERO-VINAS M, FALANGA V. Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) isoforms in wound healing and fibrosis[J]. *Wound Repair Regen*, 2016, 24(2):215-222.
- [7] 朱燕, 曾莉, 李文林, 等. 川芎嗪纳米喷雾剂调控TGF- $\beta$ /Smad信号通路抗术后大鼠腹腔粘连的实验研究[J]. *南京中医药大学学报*, 2014, 30(4):347-350.
- [8] HELLEBREKERS B W J, KOOISTRA T. Pathogenesis of postoperative adhesion formation[J]. *Br J Surg*, 2011, 98(11):1503-1516.
- [9] IMUDIA A N, KUMAR S, SAED G M, et al. Pathogenesis of intra-abdominal and pelvic adhesion development[J]. *Semin Reprod Med*, 2008, 26(4): 289-297.
- [10] 樊玉青, 吴兰兰, 李永彪, 等. 中药防治术后腹腔粘连

机制研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(18): 4358-4363.

- [11] CHIORESCU S, ANDERCOU O A, GRAD N O, et al. Intraperitoneal administration of rosuvastatin prevents postoperative peritoneal adhesions by decreasing the release of tumor necrosis factor[J]. *Clujul Med*, 2018, 91(1):79-84.
- [12] WU Y H, WEI G B, YU J H, et al. Danhong injection alleviates postoperative intra-abdominal adhesion in a rat model [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 4591384.
- [13] 张慧, 宋宇, 张婷, 等. 川芎嗪微乳凝胶预防大鼠实验性腹腔粘连抗炎及抗氧化作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(16):159-164.
- [14] FLETCHER N M, AWONUGA A O, SAED M G, et al. Lycopene, a powerful antioxidant, significantly reduces the development of the adhesion phenotype [J]. *Syst Biol Reprod Med*, 2014, 60(1):14-20.
- [15] QIN F, MA Y, LI X, et al. Efficacy and mechanism of tanshinone II<sub>A</sub> liquid nanoparticles in preventing experimental postoperative peritoneal adhesions *in vivo* and *in vitro* [J]. *Int J Nanomed*, 2015, 10:3699-3716.
- [16] GAO Q, WEI G B, WU Y H, et al. Paeoniflorin prevents postoperative peritoneal adhesion formation in an experimental rat model [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(55):93899-93911.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020:258.
- [18] YANG B, XU F Y, SUN H J, et al. Da-cheng-qi decoction, a traditional Chinese herbal formula, for intestinal obstruction: Systematic review and Meta-analysis [J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2014, 11(4):101-119.
- [19] 赵冬雨, 成丽娅, 沈宏, 等. 大承气汤治疗后粘连性肠梗阻58例[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(9): 342-344.
- [20] 李倩, 莫黎, 何永恒. 枳实通降颗粒对术后肠梗阻大鼠胃肠动力和白细胞介素6、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的影响[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2021, 21(9):1025-1027, 1031.
- [21] WANG Q H, SHU Z P, XU B Q, et al. Structural characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *Citrus aurantium* L. [J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 67:112-123.
- [22] 王梁凤, 柳小莉, 李慧婷, 等. 基于网络药理学的枳实挥发油治疗慢性传输型便秘的机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(8):1909-1917.
- [23] 齐琪, 张晴, 胡文均, 等. 小承气汤的古今文献分析

- [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(15): 115-123.
- [24] 曲中原, 冯晓敏, 邹翔, 等. 枳实研究进展[J]. 食品与药品, 2017, 19(6): 455-456.
- [25] TAN W X, LI Y, WANG Y, et al. Anti-coagulative and gastrointestinal motility regulative activities of Fructus Aurantii Immaturus and its effective fractions [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 90: 244-252.
- [26] BHARTI S, RANI N, KRISHNAMURTHY B, et al. Preclinical evidence for the pharmacological actions of naringin: A review [J]. Planta Med, 2014, 80 (6) : 437-451.
- [27] NAIR S K, BHAT I K, AURORA A L. Role of proteolytic enzyme in the prevention of postoperative intraperitoneal adhesions [J]. Arch Surg, 1974, 108 (6): 849-853.
- [28] 刘芳, 张智彬, 王邦林, 等. 加味枳术汤治疗气阴两虚型老年原发性便秘的临床疗效[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(17): 99-105.
- [29] 魏楠楠, 苏艳伟, 容志惠, 等. 中药方剂“肠粘连方”治疗新生儿肠道疾病的效果评价[J]. 临床小儿外科杂志, 2019, 18(8): 664-669.
- [30] 陈萌, 赵雅琳, 李社改. 解毒化痰通腑汤预防阑尾术后肠粘连的临床分析[J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(4): 524-527.
- [31] 邓可众, 裴美燕, 宗琪, 等. 枳实药材乙醇提取物的化学成分研究[J]. 中国药房, 2018, 29(4): 458-460.
- [32] PISMENSKY S V, KALZHANOV Z R, ELISEEVA M E, et al. Severe inflammatory reaction induced by peritoneal trauma is the key driving mechanism of postoperative adhesion formation [J]. BMC Surg, 2011, 11: 30.
- [33] SCHNÜRIGER B, BARMPPARAS G, BRANCO B C, et al. Prevention of postoperative peritoneal adhesions: A review of the literature [J]. Am J Surg, 2011, 201 (1): 111-121.
- [34] MURPHY G, NAGASE H. Progress in matrix metalloproteinase research [J]. Mol Aspects Med, 2008, 29(5): 290-308.
- [35] ROSENBLUM G, STEEN P, COHEN S R, et al. Insights into the structure and domain flexibility of full-length pro-matrix metalloproteinase-9/gelatinase B [J]. Structure, 2007, 15(10): 1227-1236.
- [36] 戴春山, 徐王磊, 王雄华, 等. 川芎嗪对大鼠肠粘连组织 MMP-9, TIMP-1 和细胞因子表达的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2013, 23(9): 695-699.
- [37] KYRIAKIDES T R, WULSIN D, SKOKOS E A, et al. Mice that lack matrix metalloproteinase-9 display delayed wound healing associated with delayed reepithelization and disordered collagen fibrillogenesis [J]. Matrix Biol, 2009, 28(2): 65-73.
- [38] LIN X, CAI Z J, YANG F, et al. Activation-induced upregulation of MMP9 in mast cells is a positive feedback mediator for mast cell activation [J]. Mol Med Rep, 2017, 15(4): 1759-1764.

[责任编辑 刘德文]