

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[△]

谢昌莹^{1*}, 余绪超¹, 葛巍¹, 吴成成¹, 肖慧荣^{1#}, 林申奇², 刘金连²(1.江西中医药大学附属医院肛肠科, 南昌 330006; 2.江西中医药大学研究生院, 南昌 330006)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)13-1617-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.13.14



摘要 **目的** 研究麻元通便止痛汤调控 AMP 活化蛋白激酶(AMPK)/内皮型一氧化氮合酶(eNOS)信号通路改善大鼠慢传输型便秘(STC)的作用机制。**方法** 将大鼠随机分为空白组、模型组和麻元通便止痛汤低、中、高剂量组(6、12、18 mg/kg), 每组10只。除空白组外, 其余各组大鼠灌胃复方地芬诺酯混悬液复制STC模型。造模成功后, 空白组和模型组大鼠灌胃生理盐水, 麻元通便止痛汤各剂量组大鼠灌胃相应药物, 每天1次, 连续2周。观察大鼠治疗前后的粪便数量及含水率; 计算大鼠的炭末推进率; 观察大鼠结肠组织的病理学变化; 检测大鼠结肠组织中一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)水平及 AMPK、eNOS、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、结节性硬化复合物1(Tsc-1)、Tsc-2、真核启动因子4E结合蛋白(4ebp)的表达水平; 筛选麻元通便止痛汤君药火麻仁、枳壳、生地的活性成分, 选择Degree值最高的活性成分与 AMPK、eNOS 进行分子对接, 以验证相互作用。**结果** 与治疗前比较, 麻元通便止痛汤各剂量组大鼠粪便数量及含水率均显著增加($P < 0.05$)。与空白组比较, 模型组大鼠炭末推进率显著降低($P < 0.05$); 结肠组织结构紊乱, 黏膜下层见大量炎症细胞浸润; 结肠组织中 NO、NOS 水平和 AMPK、eNOS、mTOR、Tsc-1、Tsc-2、4ebp 蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较, 麻元通便止痛汤各剂量组上述指标(低剂量组 NOS 除外)均显著逆转($P < 0.05$)。分子对接结果显示, 火麻仁、枳壳、生地中 Degree 值最高的活性成分分别为(Z)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]acrylamide、nobiletin、stigmaterol, 这3种成分与 AMPK 的结合能分别为-5.15、-4.61、-4.83 kJ/mol, 与 eNOS 的结合能分别为-6.11、-5.40、-5.91 kJ/mol, 且结合构象稳定、结合活性较高。**结论** 麻元通便止痛汤可改善STC模型大鼠的便秘症状和肠道功能, 其作用机制可能与抑制 AMPK/eNOS 信号通路有关。

关键词 麻元通便止痛汤; 慢传输型便秘; AMPK/eNOS 信号通路; 作用机制

Mechanism of Mayuan tongbian zhitong decoction on improving slow-transmission constipation in rats by regulating AMPK/eNOS signaling pathway

XIE Changying¹, YU Xuchao¹, GE Wei¹, WU Chengcheng¹, XIAO Huirong¹, LIN Shenqi², LIU Jinlian²(1. Dept. of Proctology, the Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006, China; 2. Graduate School, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the mechanism of Mayuan tongbian zhitong decoction on improving slow-transmission constipation (STC) in rats by regulating AMP activated protein kinase (AMPK)/endothelial nitric oxide synthase (eNOS) signaling pathway. **METHODS** The rats were randomly divided into blank group, model group, Mayuan tongbian zhitong decoction low-dose, medium-dose and high-dose groups (6, 12, 18 mg/kg), with 10 rats in each group. Except for blank group, other groups were given Compound diphenoxylate suspension to induce STC model. After modeling, blank group and model group were given normal saline intragastrically, and Mayuan tongbian zhitong decoction groups were given relevant medicine intragastrically, once a day, for consecutive 2 weeks. The number of feces and water content of feces in each group were observed before and after treatment; the carbon powder propulsion rate of rats in each group was calculated; the pathological structure of colon in each group was observed; the levels of nitric oxide (NO) and nitric oxide synthase (NOS) in colon tissues of rats in each group were detected; the expressions of AMPK, eNOS, mammalian target of rapamycin (mTOR), tuberous sclerosis complex 1 (Tsc-1), Tsc-2 and eukaryotic promoter 4E binding protein (4ebp) were also detected. The active ingredients of *Cannabis sativa*, *Citrus aurantium* and *Rehmannia glutinosa* were screened from Mayuan tongbian zhitong decoction. The active ingredients with high Degree value were docked with AMPK and eNOS, to verify the interaction. **RESULTS** Compared with before treatment, the number and water content of feces were increased significantly in Mayuan tongbian zhitong decoction groups ($P < 0.05$). Compared with blank group, carbon powder propulsion rate of model group was decreased significantly ($P < 0.05$); colonic structure was disordered, and a large number of inflammatory cells were seen in submucosa; the levels of NO and NOS in colon tissue as well as the protein expressions of AMPK,

[△] 基金项目 江西省中医药管理局科技计划项目(No.2021Z005)

* 第一作者 副主任中医师。研究方向: 肛肠疾病临床与实验研究。电话: 0791-86362902。E-mail: xiechangying8@163.com

通信作者 主任中医师。研究方向: 肛肠疾病临床与实验研究。电话: 0791-86362902。E-mail: jxszyygck@126.com

eNOS, mTOR, Tsc-1, Tsc-2 and 4ebp were increased significantly ($P < 0.05$). Compared with model group, above indexes of Mayuan tongbian zhitong decoction groups (except for NOS in low-dose group) were reserved significantly ($P < 0.05$). In the molecular docking experiment, the active components with the highest Degree values in *C. sativa*, *C. aurantium* and *R. glutinosa* were (Z)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-N-[2-(4-hydroxyphenyl) ethyl] acrylamide, nobiletin and stigmaterol. The binding energies of AMPK with these three components were -5.15 , -4.61 and -4.83 kJ/mol, the binding energies of eNOS with these three components were -6.11 , -5.40 and -5.91 kJ/mol. The conformations of these three compounds with AMPK and eNOS were stable and their binding activities were high. **CONCLUSIONS** Mayuan tongbian zhitong decoction can improve the constipation symptoms and intestinal function in STC model rats, and its specific mechanism may be related to the inhibition of AMPK/eNOS signaling pathway.

KEYWORDS Mayuan tongbian zhitong decoction; slow-transmission constipation; AMPK/eNOS signaling pathway; mechanism

慢传输型便秘 (slow-transmission constipation, STC) 主要是因肠道蠕动功能及传输速度下降而引起的一种临床常见疾病,其主要表现为大便干燥、排便困难、排便次数及便意减少^[1-2]。目前,该病的发病率呈逐年上升趋势,且该病患者常伴有腹胀,日常生活备受影响,患者情绪也愈发焦虑,极易诱发其他基础性疾病。因此,STC已成为一个公共健康问题^[3]。目前,该病的发病机制还不够明确,许多研究结果也并未对其进行深入探索,因此,临床一般多采用泻药或者促肠胃蠕动的药物进行治疗,但是此类药物一般存在不良反应。由此可知,寻找有效且安全的药物是目前亟待解决的问题。

麻元通便止痛汤是专业医师通过多年研究而得,并已在临床中证实该方具有润肠通便、止痛止血的功效^[4]。近年来研究发现,STC的发生与能量代谢紊乱密切相关,其中AMP活化蛋白激酶(AMP activated protein kinase, AMPK)作为能量代谢调节的中枢,可调节蛋白质代谢、脂质代谢、糖类代谢、自噬和线粒体稳态,对生理代谢活动具有重要意义^[5-6]。内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)是抑制胃肠道运动的重要分子,其涉及的eNOS/一氧化氮(nitric oxide, NO)信号通路是AMPK的重要下游信号^[7]。eNOS是一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的亚型之一,也是NO合成的关键酶;NO作为一种消化道抑制性神经递质,主要作用于胃肠道平滑肌,可抑制平滑肌收缩,减少胃肠道蠕动^[8]。由此推测,AMPK/eNOS信号通路对STC具有一定调控作用。但是麻元通便止痛汤是否可以通过调控AMPK/eNOS信号通路治疗STC尚不明确。因此,本研究建立STC大鼠模型,观察麻元通便止痛汤对大鼠STC的改善效果,并初探其作用机制,以期为该病的临床治疗提供新的思路。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有TDL-5-A型高速离心机、Type T2A型全自动凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司),DYY-12C型电泳仪[大龙兴创实验仪器(北京)有限公司],FSH-2A型组织匀浆机(江苏常州朗越仪器制造有限公司),WGLL823BE型恒温箱(天津市泰斯特仪器有限公司),BP310P型称量天平(德国Sartorius公司),BX53型显微镜(日本Olympus公司),RT-6100型酶标仪

(深圳雷杜生命科学股份有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

麻元通便止痛汤由江西中医药大学附属医院中药房自制(取火麻仁30 g、苦杏仁10 g、大黄6 g、郁李仁20 g、厚朴10 g、枳壳20 g、生地20 g、玄参20 g、槐花10 g、地榆10 g、延胡索12 g、白芍10 g、甘草10 g加1 500 mL水熬煎,熬至400 mL即可);其他主要药品与试剂有磷酸盐缓冲液(PBS,成都中仕石化有限公司,批号2026067),石蜡(瑞沃德生命科技有限公司,批号69019361),NO、NOS酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为20190310K8、218360343),eNOS分析试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号PL107],兔源AMPK多克隆抗体、兔源eNOS多克隆抗体、兔源哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)多克隆抗体、兔源结节性硬化复合物1(tuberous sclerosis complex 1, Tsc-1)单克隆抗体、兔源Tsc-2单克隆抗体、兔源真核启动因子4E结合蛋白(4E binding protein, 4ebp)多克隆抗体、兔源GAPDH多克隆抗体(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为AF1617、AF1587、AF1627、AF2677、AF6792、AF5812、AF1186),羊抗兔免疫球蛋白G二抗(美国Abcam公司,货号211-035-109);其余试剂为实验室常用规格,水为纯净水。

1.3 动物

本研究所用SD雄性大鼠50只,9周龄左右,体质量约260 g,购自北京科宇动物养殖中心,实验动物生产许可证号为SCXK(京)2018-0010。大鼠饲养于无菌环境中,温度为27 ℃,湿度为55%,自由进食,适应性喂养1周后进行实验。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将大鼠分为空白组、模型组和麻元通便止痛汤低、中、高剂量组,每组10只。参照文献[9]方法进行造模:除空白组外,其余各组大鼠均灌胃2.5 mg/L复方地芬诺酯混悬液(0.02 mL/g)进行造模,每日1次,连续2周。当大鼠体质量增长缓慢、粪便颗粒减少且干硬、精神较差时提示造模成功。本实验所有大鼠均造模成功。造模成功后第2天,麻元通便止痛汤低、中、高剂量组大鼠分别灌胃麻元通便止痛汤6、12、18 mg/kg(根据前期预实

验结果设置^[10],以生药量计),模型组与空白组大鼠均灌胃等体积生理盐水,每天1次,连续2周,给药期间所有大鼠自由饮食。

2.2 大鼠粪便数量及含水率的检测

收集各组大鼠治疗前(制备STC模型前14 d)和治疗后(药物治疗期间14 d)每天的全部粪便,计算粪便总数量,并称质量(即湿粪质量)。然后将全部粪便置于恒温箱中烘烤,烘烤温度为90℃,时间为3 h,烘干后再次称粪便质量(即干粪质量),计算粪便含水率[粪便含水率=(湿粪质量-干粪质量)/湿粪质量×100%]。

2.3 大鼠炭末推进率的检测

大鼠治疗结束0.5 h后,将2 mL质量浓度为50 g/L的炭末悬浊液灌入大鼠胃中,25 min后处死大鼠,将小肠(幽门至回盲部)取出,自然平铺于桌面上,自由伸展后测量小肠总长度及炭末混悬液在小肠内推进的距离,然后计算炭末推进率(炭末推进率=炭末推进距离/小肠总长度×100%)。

2.4 大鼠结肠组织的病理观察

采用苏木精-伊红(HE)染色法观察。各组大鼠取结肠组织3块,用生理盐水冲洗肠内容物后,将其中2块组织置于10%甲醛溶液中保存;另外1块组织装入冻存管中,置于-80℃冰箱中保存,用于后续实验。将于10%甲醛溶液中保存的结肠组织以流水冲洗并用乙醇脱水,再将该组织置于既溶于乙醇、又溶于石蜡的透明剂中,放入保温箱中;待石蜡完全浸入组织后进行包埋、切片(5 μm)、染色,然后采用显微镜观察各组大鼠结肠组织的病理学变化。

2.5 大鼠结肠组织中NO、NOS水平的检测

采用ELISA法检测。取各组大鼠冻存的结肠组织适量,置于液氮中,然后将其剪碎倒入匀浆管中匀浆,离心收集上清液,根据试剂盒说明书相关方法检测大鼠结肠组织中NO、NOS的水平。

2.6 大鼠结肠组织中AMPK/eNOS信号通路相关蛋白表达水平的检测

采用Western blot法检测。取各组大鼠冻存的结肠组织适量,加入裂解液裂解,以14 000 r/min离心15 min,取上清液,以BCA法测定蛋白含量。蛋白经煮沸变性后,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后转膜,以5%脱脂奶粉封闭1 h;以TBST洗膜10 min×4次,加入AMPK、eNOS、mTOR、Tsc-1、Tsc-2、4ebp、GAPDH一抗(稀释度均为1:1 000),4℃孵育过夜;以TBST洗膜10 min×4次,加入二抗(稀释度为1:2 500),室温孵育2 h;以TBST洗膜10 min×4次,加入ECL试剂显色5 min,采用全自动凝胶成像仪显影曝光。采用Image J v1.8.0软件对条带灰度值进行分析,以目的蛋白与内参GAPDH灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。

2.7 麻元通便止痛汤中活性成分的筛选

麻元通便止痛汤中的君药包括火麻仁、枳壳、生地,

其中火麻仁具有润肠、滑肠的功效,枳壳行气消积,生地泄肠道实火、泻下攻积,三者相辅相成^[9]。为研究麻元通便止痛汤中活性成分与AMPK/eNOS信号通路的关联,笔者首先通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP,网址为http://lsp.nwsuaf.edu.cn/tcmsp.php)检索麻元通便止痛汤中火麻仁、枳壳、生地的活性成分,以口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%和药物相似性(drug likeness, DL)≥0.18作为筛选条件,筛选麻元通便止痛汤中活性较高的成分,并参考文献[11]进行补充,即得麻元通便止痛汤的活性成分。

2.8 麻元通便止痛汤中活性成分与AMPK、eNOS的分子对接分析

选择麻元通便止痛汤君药各药材Degree值最高的活性成分进行分子对接^[12]。检索并下载TCMSP数据库中活性成分的2D结构和3D结构,采用YASARA分子模拟软件经去H₂O、加H质子化和添加缺失原子后,运用PyMOL、AutoDockVina等软件进行分子对接。

2.9 统计学方法

采用SPSS 21.0软件对数据进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 大鼠粪便数量、含水率及炭末推进率的检测结果

治疗前后,与空白组比较,模型组大鼠粪便数量、含水率及炭末推进率均显著减少或降低($P<0.05$)。治疗后,与模型组比较,麻元通便止痛汤各剂量组大鼠粪便数量、含水率及炭末推进率均显著增加或升高($P<0.05$)。与治疗前比较,麻元通便止痛汤各剂量组大鼠粪便数量及含水率均显著增加或升高($P<0.05$)。结果见表1。

表1 各组大鼠粪便数量、含水率及炭末推进率的检测结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	粪便数量/粒		粪便含水率/%		炭末推进率/%
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	
空白组	65.50±5.68	65.40±5.74	38.98±5.34	39.85±5.49	68.58±3.52
模型组	45.60±3.57 ^a	45.60±3.05 ^a	21.28±3.69 ^a	21.44±3.47 ^a	42.15±3.18 ^a
麻元通便止痛汤低剂量组	46.30±2.06	55.30±3.02 ^{bc}	20.69±3.57	32.59±2.58 ^{bc}	50.27±2.59 ^b
麻元通便止痛汤中剂量组	46.10±2.18	59.30±3.53 ^{bc}	20.54±3.77	35.17±2.14 ^{bc}	55.67±2.45 ^b
麻元通便止痛汤高剂量组	46.10±2.08	63.60±3.27 ^{bc}	20.97±3.48	38.09±2.26 ^{bc}	64.08±3.54 ^b
F	65.101	41.678	40.469	44.948	117.388
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

a:与空白组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与同组治疗前比较, $P<0.05$

3.2 大鼠结肠组织病理观察结果

HE染色结果显示,空白组大鼠结肠组织结构清晰,黏膜上皮结构较好,细胞排列整齐均匀;模型组大鼠结肠组织结构紊乱,肌层较薄,黏膜下层见大量炎症细胞浸润;麻元通便止痛汤各剂量组大鼠结肠组织结构逐渐清晰,黏膜下层炎症细胞浸润明显减少,且随剂量的增加,黏膜排列结构和肌层厚度与空白组差异不大。结果见图1。

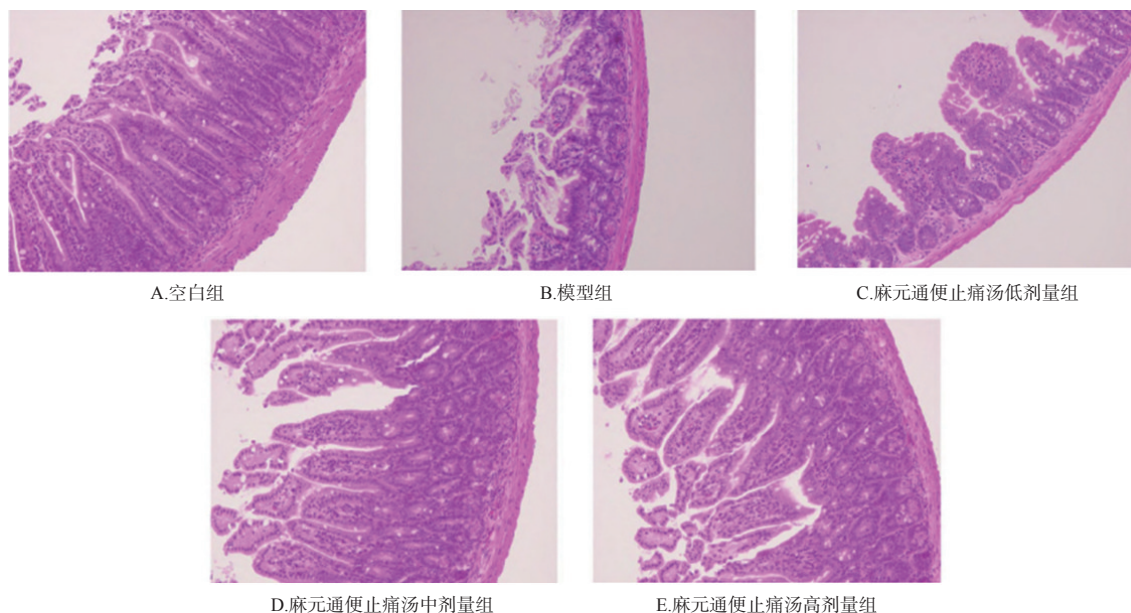


图1 各组大鼠结肠组织 HE 染色病理观察结果 (×200)

3.3 大鼠结肠组织中 NO、NOS 水平的检测结果

与空白组比较,模型组大鼠结肠组织中 NO、NOS 水平均显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,麻元通便止痛汤各剂量组大鼠结肠组织中 NO、NOS(麻元通便止痛汤低剂量组除外)水平均显著降低($P < 0.05$)。结果见表2。

表2 各组大鼠结肠组织中 NO、NOS 水平的检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	NO/(mmol/g)	NOS/(U/mg)
空白组	5.05 ± 0.85	0.82 ± 0.05
模型组	29.69 ± 3.05 ^a	4.17 ± 0.52 ^a
麻元通便止痛汤低剂量组	22.58 ± 2.09 ^b	3.57 ± 1.29
麻元通便止痛汤中剂量组	18.45 ± 1.84 ^b	2.11 ± 0.89 ^b
麻元通便止痛汤高剂量组	9.58 ± 1.03 ^b	1.16 ± 0.59 ^b
<i>F</i>	260.179	35.067
<i>P</i>	<0.001	<0.001

a: 与空白组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$

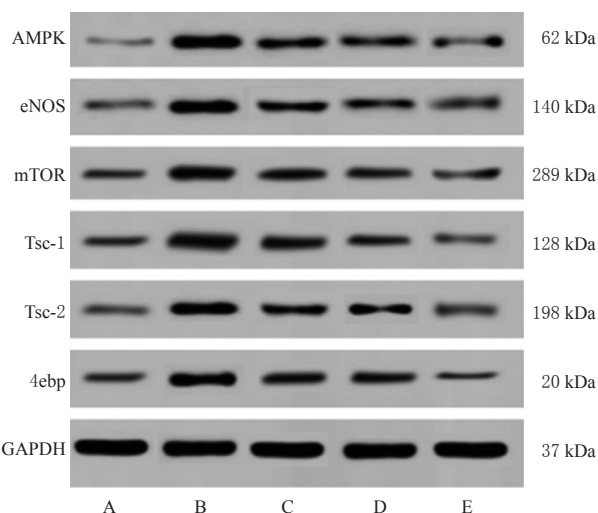
3.4 大鼠结肠组织中 AMPK/eNOS 信号通路相关蛋白表达水平的检测结果

与空白组比较,模型组大鼠结肠组织中 AMPK、eNOS、mTOR、Tsc-1、Tsc-2、4ebp 蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,麻元通便止痛汤各剂量组大鼠结肠组织中上述指标表达水平均显著降低($P < 0.05$)。结果见表3、图2。

表3 各组大鼠结肠组织中 AMPK/eNOS 信号通路相关蛋白表达水平的检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	AMPK	eNOS	mTOR	Tsc-1	Tsc-2	4ebp
空白组	0.59 ± 0.16	0.68 ± 0.13	0.48 ± 0.06	0.95 ± 0.13	0.53 ± 0.09	0.67 ± 0.07
模型组	1.43 ± 0.19 ^a	1.87 ± 0.21 ^a	1.68 ± 0.17 ^a	1.69 ± 0.18 ^a	1.47 ± 0.11 ^a	1.58 ± 0.12 ^a
麻元通便止痛汤低剂量组	1.05 ± 0.08 ^b	1.54 ± 0.15 ^b	1.42 ± 0.13 ^b	1.45 ± 0.12 ^b	1.26 ± 0.08 ^b	1.34 ± 0.08 ^b
麻元通便止痛汤中剂量组	0.82 ± 0.06 ^b	1.03 ± 0.09 ^b	1.05 ± 0.09 ^b	1.21 ± 0.08 ^b	1.01 ± 0.07 ^b	1.19 ± 0.06 ^b
麻元通便止痛汤高剂量组	0.63 ± 0.05 ^b	0.87 ± 0.07 ^b	0.75 ± 0.04 ^b	1.07 ± 0.06 ^b	0.69 ± 0.04 ^b	0.77 ± 0.04 ^b
<i>F</i>	81.371	126.240	203.425	61.167	238.016	241.610
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

a: 与空白组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$



A: 空白组; B: 模型组; C: 麻元通便止痛汤低剂量组; D: 麻元通便止痛汤中剂量组; E: 麻元通便止痛汤高剂量组

图2 各组大鼠结肠组织中 AMPK/eNOS 信号通路相关蛋白表达的电泳图

3.5 麻元通便止痛汤活性成分的筛选结果

麻元通便止痛汤的君药包括火麻仁、枳壳和生地,设置 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$,同时去除无对应靶点的成分,最终筛选出火麻仁活性成分6种、枳壳活性成分5种、生地活性成分2种,结果见表4。

3.6 麻元通便止痛汤活性成分与 AMPK、eNOS 的分子对接结果

根据 Degree 值得出火麻仁中评分最高的活性成分为 (Z)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]acrylamide, 枳壳中评分最高的活性成分为 nobiletin, 生地中评分最高的活性成分为 stigmasterol 等。运用 PyMOL、AutoDock Vina 等软件对 AMPK、eNOS 蛋白进行分子对接,并测定结合能。结果显示,

表4 麻元通便止痛汤活性成分的筛选结果

化合物ID	化合物名称	OB/%	DL	所属中药	Degree值
MOL005030	gondoic acid	30.70	0.20	火麻仁	24.47
MOL000006	luteolin	36.16	0.25	火麻仁	29.11
MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	火麻仁	39.61
MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76	火麻仁	44.42
MOL001439	arachidonic acid	45.57	0.20	火麻仁	34.38
MOL000483	(Z)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]acrylamide	118.35	0.26	火麻仁	84.10
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	枳壳	39.61
MOL013381	marmin	38.23	0.31	枳壳	40.48
MOL004328	naringenin	59.29	0.21	枳壳	43.73
MOL005828	nobiletin	61.67	0.52	枳壳	52.27
MOL002341	hesperetin	70.31	0.27	枳壳	51.51
MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	生地	39.61
MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76	生地	44.42

AMPK 与 (Z)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]acrylamide 的结合能为 -5.15 kJ/mol, 与 nobiletin 的结合能为 -4.61 kJ/mol, 与 stigmasterol 的结合能为 -4.83 kJ/mol; eNOS 与 (Z)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]acrylamide 的结合能为 -6.11 kJ/mol, 与 nobiletin 的结合能为 -5.40 kJ/mol, 与 stigmasterol 的结合能为 -5.91 kJ/mol。具体结合模式见图3、图4。

4 讨论

STC 是病因极为复杂的疾病,且随着社会经济的发展、生活节奏的加快及精神压力的加重,该病的发病率也越来越高^[13]。现有的研究对该病发生的病理生理机制并不深入,治疗方法虽然较多,但是效果并不理想。除此之外,已有研究指出,许多患者存在抑郁和焦虑等问题,且与病情发展密切相关^[14-15]。因此,该病的治疗越来越受到临床关注。中医认为 STC 属于“便秘”的范畴。在《诸病源候论·大便难候》中也有记载“大便难者,由五脏不调,阴阳偏有虚实,谓三焦不和则冷热并结故也”,并指出该病的病因与机体脏腑的寒热虚实有关^[16]。本研究中的麻元通便止痛汤由中药火麻仁、苦杏仁、大黄、郁李仁、厚朴、枳壳、生地、玄参、槐花、地榆、延胡索、白芍、甘草组成,其中火麻仁、苦杏仁、郁李仁共同增强润肠、滑肠的功效;大黄、生地泄肠道实火,泻下攻积;厚朴、枳壳行气消积;玄参清胃肠虚热的同时,解大黄药性的峻烈;槐花、地榆止血;延胡索、白芍止痛;甘草清热解毒,调和诸药;最终达到润肠攻积、行气清热、止血止痛的功效^[13]。本课题组前期研究已证实,麻元通便止痛汤对便秘有明确疗效,但是具体机制并不明确^[17]。

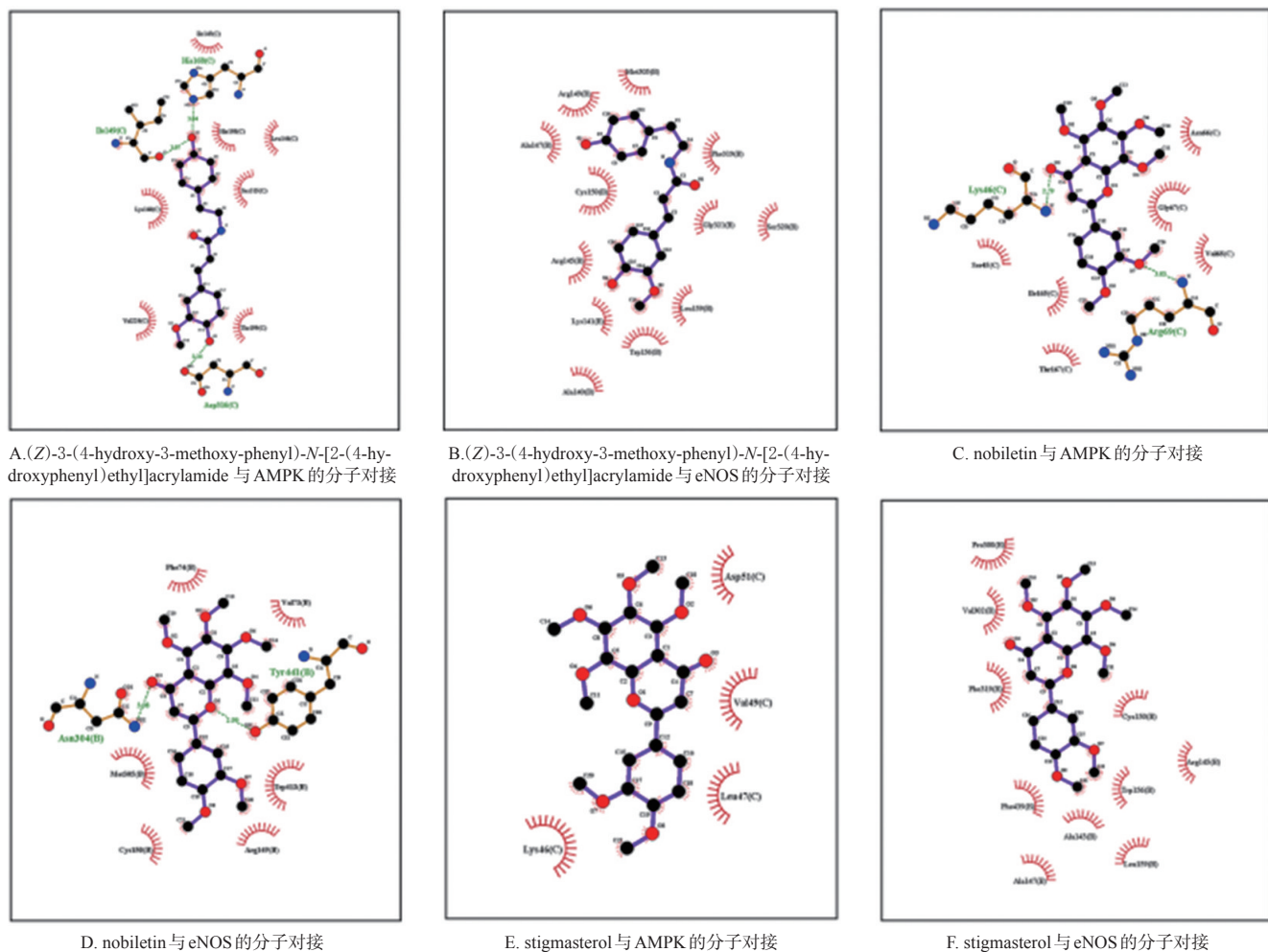


图3 麻元通便止痛汤活性成分与 AMPK、eNOS 作用的 2D 图

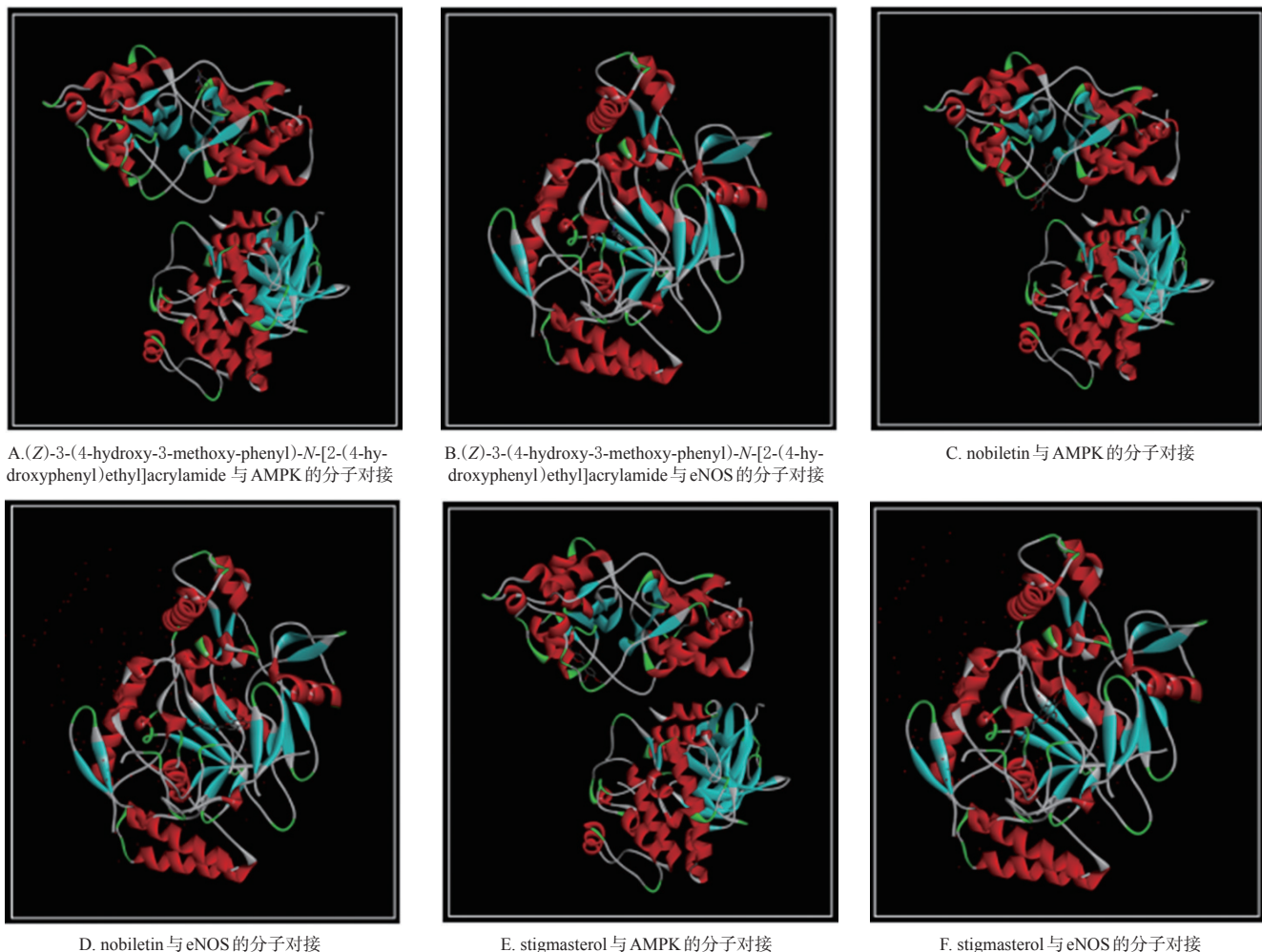


图4 麻元通便止痛汤活性成分与 AMPK、eNOS 作用的 3D 图

已有研究表明, AMPK/eNOS 信号通路可以抑制内皮细胞氧化应激反应和炎症反应, 从而促进内皮修复, 发挥抗炎、抗凋亡的作用^[18-19]。其中, 抑制 eNOS 信号通路可减少结肠组织中 NO、eNOS 的含量, 从而抑制平滑肌收缩, 减少胃肠道的蠕动^[20-21]。目前, 尚未有相关研究提到此通路与 STC 有相关性, 基于此, 本研究针对 AMPK/eNOS 信号通路研究麻元通便止痛汤改善 STC 的作用机制。

STC 主要因肠道传输减慢, 导致粪便在肠道中滞留过久, 水分重吸收增加, 致使大便干硬、排便时间延长、粪便排出困难。目前 STC 的发病机制尚不明确。本研究首先观察了大鼠治疗前后粪便数量和含水率的变化, 结果显示, 治疗后, 与模型组比较, 麻元通便止痛汤各剂量组大鼠粪便数量及含水率均显著增加, 表明麻元通便止痛汤可改善大鼠便秘情况。而经麻元通便止痛汤干预后, 大鼠炭末推进率显著增加, 表明麻元通便止痛汤可改善大鼠的肠道蠕动功能。此外, 本研究还观察了大鼠的结肠组织病理变化, 结果显示, 经麻元通便止痛汤干预后, 大鼠结肠组织结构逐渐清晰, 黏膜下层炎症细

胞浸润明显减少, 且随剂量的增加, 黏膜排列结构和肌层厚度与空白组差异不大, 表明麻元通便止痛汤对 STC 的疗效较好。而经麻元通便止痛汤干预后, 大鼠结肠组织中 NO、eNOS 水平显著降低, 表明该药可能对大鼠胃肠道功能有一定的改善作用。

研究发现, Tsc-1、Tsc-2 是 mTOR 活性调控的关键抑制因子, 活化后的 Tsc-1、Tsc-2 可以抑制 mTOR 的活性, 从而抑制细胞生长; 其次, mTOR 可进一步激活其下游因子 4ebp, 发挥调节下游蛋白翻译的作用^[22-23]。而 AMPK 位于 mTOR 的上游, AMPK 的活化可正向促进 mTOR 的表达, 但 mTOR、Tsc-1、Tsc-2、4ebp 是否也可参与调控 STC 尚不明确。基于此, 笔者采用 Western blot 法同时检测大鼠结肠组织中 AMPK、eNOS、mTOR、Tsc-1、Tsc-2、4ebp 蛋白的表达水平, 结果显示, 经麻元通便止痛汤干预后, 大鼠结肠组织中上述蛋白表达水平均显著降低。这表明, 麻元通便止痛汤可通过抑制 AMPK/eNOS 信号通路改善 STC 模型大鼠的便秘症状及肠道功能。

火麻仁、枳壳和生地为麻元通便止痛汤的君药, 分

子对接分析结果显示,火麻仁、枳壳、生地中 Degree 值评分最高的活性成分分别为(Z)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]acrylamide、nobiletin、stigmasterol,这3种成分与 AMPK 的结合能分别为-5.15、-4.61、-4.83 kJ/mol,与 eNOS 的结合能分别为-6.11、-5.40、-5.91 kJ/mol,且这3种成分与 AMPK、eNOS 的构象稳定、结合活性较高,进一步说明麻元通便止痛汤对 STC 模型大鼠的改善作用与 AMPK/eNOS 信号通路有关。

综上所述,麻元通便止痛汤可改善 STC 模型大鼠的便秘症状和肠道功能,其作用机制可能与抑制 AMPK/eNOS 信号通路有关。

参考文献

[1] 赵强,康进,郑亮,等.桂萸散加减自动化热奄包在治疗气虚型老年慢传输型便秘的临床研究[J].四川中医,2020,38(10):97-99.

[2] SUNDBØLL J, THYGESEN S K, VERES K, et al. Risk of cancer in patients with constipation[J]. Clin Epidemiol, 2019,11:299-310.

[3] 范艺缤,魏照洲,唐学贵,等.调脏舒秘汤加减治疗慢传输型便秘临证探析[J].实用中医药杂志,2019,35(6):749-750.

[4] 张丽娅,李刚,王永兵.中药干预慢传输型便秘肠道水通道蛋白表达及其作用机制的研究进展[J].中成药,2021,43(1):163-167.

[5] 赵迪.基于代谢组学和肠道微生物组学的便秘与衰老的相关性研究[D].太原:山西大学,2021.

[6] 李晓媚,陈丝秦,梁雪,等.蛋白质精氨酸甲基转移酶 1 在糖尿病小鼠肠屏障功能障碍中的作用[J].中国病理生理杂志,2022,38(5):819-828.

[7] ONO H, NAKAMURA A, MATSUMOTO K, et al. Circular muscle contraction in the mice rectum plays a key role in morphine-induced constipation[J]. Neurogastroenterol Motil, 2014,26(10):1396-1407.

[8] 唐东辉,刘润芝,李娟,等.8周游泳运动干预对肥胖小鼠血管内皮功能的改善及其炎症机制[J].中国体育科技,2016,52(6):86-91.

[9] 赵兵,唐学贵,吴至久,等.复方地芬诺酯建立便秘模型与 AQP8 的相关性研究[J].中医临床研究,2015,7(18):107-110.

[10] 谢昌营,吴成成,肖慧荣.麻元通便止痛汤对慢传输型便秘大鼠肠道推进功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(7):154-158.

[11] 安国庆.清热通便汤防治湿热下注型混合痔术后排便困难临床疗效观察[D].昆明:云南中医药大学,2020.

[12] SAITO T, TANAKA S. Molecular mechanisms underlying osteoarthritis development: notch and NF- κ B[J]. Arthritis Res Ther, 2017,19(1):94.

[13] 陈思敏,关丽娜,庞峻,等.生白术对慢传输型便秘模型大鼠结肠水通道蛋白表达影响的研究[J].新中医,2019,51(6):12-16.

[14] 刘洋,倪健,朱晓文,等.六味安消胶囊对慢传输型便秘大鼠肠道推进功能影响的实验研究[J].临床和实验医学杂志,2018,17(21):2268-2272.

[15] 黄业保,肖倩,刘春强.中医药治疗慢传输型便秘的临床研究进展[J].中医药临床杂志,2020,32(8):1579-1582.

[16] 唐冉,王建民,王培森,等.益气健脾通便方对慢传输型便秘大鼠 PI3K/Akt/eNOS 信号途径作用机制研究[J].辽宁中医药大学学报,2018,20(12):40-43.

[17] 余绪超,谢昌营,肖慧荣,等.麻元通便止痛汤治疗混合痔术后便秘的临床研究[J].实用中西医结合临床,2016,16(6):28-30.

[18] 王玉香,燕燕,李永芳,等.沉默 MAP4K4 通过调控 PPAR γ /ABCA1 通路缓解 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤[J].中国动脉硬化杂志,2021,29(1):54-59.

[19] 李灵,丁艳平,邵宝平.腺苷酸活化蛋白激酶在神经炎症中的作用[J].中国免疫学杂志,2021,37(6):739-746.

[20] 朱飞叶,谢冠群,徐珊.芍药甘草汤对慢传输型便秘大鼠 ICC 及肠神经递质的影响[J].中华中医药杂志,2016,31(1):248-251.

[21] SHAHID S, RAMZAN Z, MAURERA H, et al. Chronic idiopathic constipation: more than a simple colonic transit disorder[J]. J Clin Gastroenterol, 2012,46(2):150-154.

[22] 李旭,张雪燕,杨世培,等.中药多糖抗衰老作用机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(4):271-282.

[23] 王伟杰,刘恩令,魏靖文,等.ERP29 通过 mTOR 信号通路对卵巢癌 SKOV3 细胞生物学行为的影响[J].华北理工大学学报(医学版),2020,22(4):263-268,273.

(收稿日期:2021-12-28 修回日期:2022-06-01)

(编辑:唐晓莲)