

衢陈皮提取物通过 c-Src/Akt 通路改善功能性消化不良肠屏障损伤作用机制

吴 芮, 蔡明秀, 何 顺, 叶笑笑, 祝雅芸, 梁泽华*

浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311402

摘 要: 目的 阐明衢陈皮提取物 (Quzhou *Citri Reticulatae Pericarpium* extract, CPE) 的物质基础, 并探讨其通过修复肠屏障改善功能性消化不良 (functional dyspepsia, FD) 的作用机制。方法 采用水煎提取联合冷冻干燥制备 CPE, 利用超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱联用技术与高效液相色谱技术进行成分定性与定量分析, 通过网络药理学预测潜在作用靶点与通路。体内实验采用碘乙酰胺联合不规则进食法建立 FD 大鼠模型, 给予药物干预后, 检测胃排空率、小肠推进率; 采用苏木素-伊红染色分析胃肠组织病理学变化; 采用 ELISA 检测血清中脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、二胺氧化酶 (diamine oxidase, DAO) 水平及十二指肠组织肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平; 采用免疫组化法检测十二指肠组织闭锁小带蛋白-1 (zonula occludens-1, ZO-1) 和闭合蛋白 (Occludin) 的表达。体外实验构建 TNF- α 诱导的 Caco-2 肠道细胞屏障损伤模型, 测定跨上皮电阻 (transepithelial electrical resistance, TEER) 值和相对分子质量为 4×10^4 的异硫氰酸荧光素-葡聚糖 (fluorescein isothiocyanate-dextran with relative molecular mass 4×10^4 , FD-4) 通透性; 采用免疫荧光染色观察 ZO-1 和 Occludin 蛋白分布; 采用 qRT-PCR 检测 *ZO-1*、*Occludin*、白细胞介素-6 (interleukin-6, *IL-6*) 和 *TNF- α* 的 mRNA 表达; 采用 ELISA 检测 *IL-6* 分泌; 采用 Western blotting 检测 c-Src 原癌基因 (cellular Src, c-Src) 和蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 的磷酸化水平。结果 从 CPE 中鉴定出 84 个化学成分, 其中 8 个为首次在陈皮中报道; 4 种主要黄酮类成分的含量由高到低为橙皮苷 > 芸香柚皮苷 > 川陈皮素 > 桔皮素。网络药理学预测显示, CPE 改善 FD 的潜在核心靶点涉及 SRC、AKT1 等, 相关通路富集于磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/Akt 信号通路及紧密连接调控。体内实验表明, CPE 可显著改善 FD 大鼠的胃肠动力障碍 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 修复十二指肠黏膜损伤, 显著降低血清 LPS 和 DAO 水平 ($P < 0.01$ 、 0.001), 抑制十二指肠组织 TNF- α 蛋白及基因表达 ($P < 0.01$ 、 0.001), 上调 Occludin 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.001)。体外实验证实, CPE 中橙皮苷的实际含量仅为橙皮苷单体组的 10.48%, 但在稳定 TEER、降低 FD-4 通透性方面与橙皮苷单体等效 ($P < 0.01$ 、 0.001); CPE 可显著上调 *ZO-1* 和 *Occludin* 的 mRNA 表达 ($P < 0.001$), 并维持其连续网状分布, 显著抑制 *IL-6* 的转录与分泌 ($P < 0.01$ 、 0.001), 并显著降低 p-c-Src/c-Src 和 p-Akt/Akt 的值 ($P < 0.05$)。结论 CPE 可显著改善 FD 大鼠的胃肠动力障碍与十二指肠黏膜屏障损伤, 并改善 TNF- α 诱导的 Caco-2 细胞屏障功能与炎症状态, 其作用依赖于对 c-Src/Akt 信号通路过度激活的抑制, 且其整体效应体现了多组分协同增效的特点, 为衢陈皮在胃肠疾病中的应用提供了实验依据。

关键词: 衢陈皮; 功能性消化不良; Caco-2 细胞; 肠道屏障损伤; 紧密连接; 炎症; c-Src/Akt 信号通路; 芸香柚皮苷; 橙皮苷; 川陈皮素; 桔皮素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)19-7666-19

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.19.014

Mechanism of Quzhou *Citri Reticulatae Pericarpium* extract in improving functional dyspepsia-associated intestinal barrier damage via c-Src/Akt pathway

WU Rui, CAI Mingxiu, HE Shun, YE Xiaoxiao, ZHU Yayun, LIANG Zehua

School of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 311402, China

Abstract: Objective To elucidate the material basis of Quzhou Chenpi (*Citri Reticulatae Pericarpium*) extract (CPE) and to investigate its mechanism in improving functional dyspepsia (FD) by repairing the intestinal barrier. **Methods** CPE was prepared by water decoction combined with freeze-drying. Qualitative and quantitative analyses of its chemical components were performed using

收稿日期: 2026-04-03

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目 (762213V00102)

作者简介: 吴 芮 (2001—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药效与新产品开发。E-mail: ruiwu2001@163.com

*通信作者: 梁泽华 (1976—), 女, 教授, 博士, 从事中药炮制工艺及质量标准研究。E-mail: 1046698407@qq.com

ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) and high-performance liquid chromatography (HPLC), followed by network pharmacology to predict potential targets and pathways. *In vivo*, an FD rat model was established by iodoacetamide combined with irregular feeding. After drug intervention, gastric emptying rate and small intestinal propulsion rate were measured. Histopathological changes in the stomach and duodenum were examined by hematoxylin-eosin staining. Levels of lipopolysaccharide (LPS), diamine oxidase (DAO) in serum as well as tumor necrosis factor- α (TNF- α) in duodenal tissue were determined by ELISA. The expressions of zonula occludens-1 (ZO-1) and Occludin in duodenal tissue was assessed by immunohistochemistry. *In vitro*, a TNF- α -induced Caco-2 intestinal barrier injury model was used. Transepithelial electrical resistance (TEER) value and fluorescein isothiocyanate-dextran with relative molecular mass 4×10^4 (FD-4) permeability were measured. The distribution of ZO-1 and Occludin proteins was observed by immunofluorescence staining. The mRNA expressions of *ZO-1*, *Occludin*, interleukin-6 (*IL-6*) and *TNF- α* were detected by qRT-PCR. IL-6 secretion was measured by ELISA. The phosphorylation levels of cellular Src (c-Src) and protein kinase B (Akt) were detected by Western blotting. **Results** A total of 84 chemical components were identified from CPE, eight of which were reported in *Citri Reticulatae Pericarpium* for the first time. The contents of the four major flavonoids were ranked from high to low as hesperidin > narirutin > nobiletin > tangeretin. Network pharmacology predicted that the potential core targets of CPE for improving FD involved SRC, AKT1, etc., with enrichment in phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway and tight junction regulation. *In vivo*, CPE significantly ameliorated gastrointestinal motility disorders in FD rats ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), alleviated duodenal mucosal injury, reduced levels of LPS and DAO in serum ($P < 0.01, 0.001$), suppressed TNF- α protein and mRNA expressions in duodenal tissue ($P < 0.01, 0.001$), and up-regulated Occludin protein expression ($P < 0.05, 0.001$). *In vitro*, the actual hesperidin content in CPE was only 10.48% of that in the hesperidin monomer group, yet CPE was equivalent to hesperidin monomer in stabilizing TEER and reducing FD-4 permeability ($P < 0.01, 0.001$). CPE significantly up-regulated the mRNA expressions of *ZO-1* and *Occludin* ($P < 0.001$), maintained their continuous network-like distribution, significantly inhibited IL-6 transcription and secretion ($P < 0.01, 0.001$), and significantly reduced the values of p-c-Src/c-Src and p-Akt/Akt ($P < 0.05$). **Conclusion** CPE significantly ameliorates gastrointestinal motility disorders and duodenal mucosal barrier injury in FD rats, and alleviates barrier dysfunction and inflammation in TNF- α -induced Caco-2 cells. Its effect depends on the inhibition of over-activation of c-Src/Akt signaling pathway. The overall efficacy demonstrates the multi-component synergistic characteristics of traditional Chinese medicine, providing an experimental basis for the application of Quzhou *Citri Reticulatae Pericarpium* in gastrointestinal diseases.

Key words: Quzhou *Citri Reticulatae Pericarpium*; functional dyspepsia; Caco-2 cells; intestinal barrier injury; tight junction; inflammation; c-Src/Akt signaling pathway; narirutin; hesperidin; nobiletin; tangeretin

功能性消化不良 (functional dyspepsia, FD) 是一种临床常见的功能性胃肠病, 表现为餐后饱胀、早饱、上腹痛或烧灼感等症状, 但经常规检查无法发现可解释症状的器质性病变^[1]。FD 在全世界的患病率较高 (西方国家 10%~40%, 亚洲 5%~30%), 严重影响患者生活质量。目前 FD 的病理生理机制尚未完全阐明, 涉及胃肠动力障碍、内脏高敏感、十二指肠屏障功能障碍、低度炎症及脑-肠轴调节异常等多种因素^[2]。

近年来, 十二指肠屏障功能障碍和低度炎症在 FD 发病中的作用备受关注。Vanheel 等^[3]研究证实, FD 患者存在十二指肠黏膜完整性受损, 表现为跨上皮电阻 (transepithelial electrical resistance, TEER) 降低、通透性增加, 并伴有肥大细胞和嗜酸性粒细胞浸润的低度炎症; 进一步研究发现, 紧密连接蛋白表达异常与通透性改变显著相关, 表明修复十二指肠屏障可能是 FD 治疗靶点。随后多项研究证实,

十二指肠屏障破坏导致腔内抗原物质如脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 移位^[4], 激活黏膜免疫释放肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等炎症介质, 后者不仅可直接致敏传入神经末梢, 还可进一步破坏紧密连接结构, 形成屏障损伤与炎症的恶性循环^[5]。因此, 修复屏障、抑制炎症已成为 FD 治疗研究的重要方向。

目前 FD 的常规治疗主要使用促胃肠动力药、胃黏膜保护剂、抑酸剂等。但是, 上述化学药物长期使用效果较为缓慢且疗效不理想, 常出现胃肠道不良反应和耐药性^[2], 亟需开发新的治疗策略。根据 FD 的罗马 IV 诊断标准, 其可分为上腹疼痛综合征 (epigastric pain syndrome, EPS) 和餐后不适综合征 (postprandial distress syndrome, PDS)^[6], 分别归属于中医“胃脘痛”和“痞满”的范畴。在中医药治疗 FD 的临床实践中, 陈皮是使用频次最高的药物之一^[7], 其在《中华医典》治疗“胃脘痛”及

《普济方》治疗“痞满”的方剂中,用药频次均居首位^[8]。陈皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果皮,具有理气健脾、燥湿化痰之功效^[9],临床常用于脘腹胀满、食少吐泻等 FD 相关症状的治疗。《本草纲目》言陈皮“疗呕哕反胃嘈杂,时吐清水”,味苦、辛,性温,辛开苦降,调畅中焦,为治疗“痞满”用药。现代研究表明,陈皮主要活性成分包括黄酮类化合物(如橙皮苷、柚皮苷)及挥发油等,具有抗炎、抗氧化及调节胃肠动力的作用^[10]。陈皮的化学成分与药理活性受产地、品种及炮制方法影响,不同道地产区之间存在差异。目前研究多集中于广陈皮,而衢州作为陈皮的道地产区之一,所产衢陈皮历史悠久、品质优良。自 2018 年起,浙江省衢州市将源自椪柑的衢陈皮列入“衢六味”地方特色药材系列,作为重点品种进行培育。目前,当地椪柑种植已具有一定规模,年产量相对稳定,衢陈皮在市场上已有流通,展现出良好的资源基础和产业化前景^[11]。然而,衢陈皮的化学成分及现代药理研究仍相对薄弱,对 FD 胃肠功能的调节作用及机制缺乏系统探讨。

本研究首先采用更贴近临床传统用药方式的水煎提取工艺制备衢陈皮提取物(*Quzhou Citri Reticulatae Pericarpium extract*, CPE),并经冷冻干燥保存,以最大程度保留其原始化学成分特征;在此基础上,对衢陈皮提取物利用超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱联用技术(*ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry*, UPLC-Q-TOF-MS^E)进行成分定性分析,并利用高效液相色谱技术(*high-performance liquid chromatography*, HPLC)对其主要黄酮类成分进行含量测定,明确其物质基础;进而通过网络药理学预测结合 FD 大鼠模型及人结直肠腺癌 Caco-2 细胞屏障损伤模型,从肠黏膜屏障修复视角探讨 CPE 对 FD 的治疗作用及潜在机制,重点关注其对 c-Src 原癌基因(*cellular Src*, c-Src)/蛋白激酶 B(*protein kinase B*, Akt)信号通路的调控作用,以期为衢陈皮的开发利用和 FD 治疗提供新的科学依据。

1 材料

1.1 动物与细胞

SPF 级 SD 大鼠 72 只,雌雄各半,鼠龄 7 d, 体质量(21±4)g;母鼠 6 只,与所带乳鼠同笼饲养,为其提供母乳,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号 SYXK(沪)2022-0012,动物

质量合格证号 NO.20220004078293。动物实验经浙江中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号 IACUC-20250603-09)。饲养环境温度控制在 22~25℃,相对湿度为 50%~60%,光照周期为 12 h 昼夜节律。母鼠使用全颗粒饲料喂养,自由进食饮水。

Caco-2 细胞(编号 KCB200710YJ)购自中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库。

1.2 药材

陈皮由浙江衢州大健康产业园提供,经浙江中医药大学药学院梁泽华教授鉴定为芸香科柑橘属植物橘 *C. reticulatae* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果皮。

1.3 药品与试剂

对照品芸香柚皮苷(批号 J06HB172580,质量分数≥98%)、橙皮苷(批号 JB269789,质量分数≥98%)、川陈皮素(批号 O08GB163035,质量分数≥98%)、桔皮素(批号 H24F11K108893,质量分数≥98%)、辛弗林(批号 B20182,质量分数≥98%)购自上海源叶生物科技有限公司;碘乙酰胺(批号 V900335)、羧甲基纤维素钠(批号 Y11A7X192)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;多潘立酮(批号 NHJ3329)购自西安杨森制药有限公司;4%多聚甲醛(批号 22567544V)购自北京兰杰柯科技有限公司;舒泰 50(批号 9KWEA)购自法国 Virbac 公司;大鼠 LPS、二胺氧化酶(*diamine oxidase*, DAO) ELISA 检测试剂盒(批号分别为 ML003526、ML003420)购自上海酶联生物科技有限公司;大鼠 TNF-α ELISA 检测试剂盒(批号 SYP-R0356)、人白细胞介素-6(*interleukin-6*, IL-6) ELISA 检测试剂盒(批号 SYP-H0064)、c-Src 兔单克隆抗体(批号 10138102B4715)、p-c-Src(Tyr419)兔单克隆抗体(批号 10138102B4303)、Akt 兔单克隆抗体(批号 10138102B4652)、p-Akt(Ser473)兔单克隆抗体(批号 10138102B4292)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号 10138102I537H)购自杭州优品生物科技有限公司;0.25%胰蛋白酶消化液(批号 2025122502)购自湖州森瑞生物科技有限公司;DMEM 培养基(批号 6125319)、胎牛血清(*fetal bovine serum*, FBS, 批号 C0234)购自美国 Gibco 公司;青霉素-链霉素双抗(批号 C100C5)购自苏州新赛美生物科技有限公司;PBS 缓冲液(批号 31624968CJ)购自安徽白鲨生物科技有限公司;牛血清白蛋白(*bovine serum albumin*, BSA, 批号

EZ65B0FC36) 购自 BioFROXX 公司; 重组人 TNF- α 细胞因子 (货号 300-01A-10UG) 购自美国 PeproTech 公司; 相对分子质量为 4×10^4 的异硫氰酸荧光素-葡聚糖 (fluorescein isothiocyanate-dextran with relative molecular mass 4×10^4 , FD-4, 批号 A257250606) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 闭锁小带蛋白-1 (zonula occludens-1, ZO-1) 兔单克隆抗体 (批号 HA722851)、闭合蛋白 (Occludin) 兔单克隆抗体 (批号 R1510-33) 购自杭州华安生物技术有限公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 兔单克隆抗体 (批号 01941125) 购自上海雅酶生物医药科技有限公司; DAPI 染色试剂 (批号 2503F001) 购自武汉塞维尔生物科技有限公司; Alexa Fluor[®] 488 标记山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 BK-R488)、RNAiso Plus (批号 A050992A)、PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 反转录试剂盒 (批号 AO21374A) 购自日本 TaKaRa 公司; ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒 (批号 7E0350F5) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; Transwell 细胞培养小室 (货号 14312-D) 购自北京兰杰柯科技有限公司; qRT-PCR 引物购自生工生物 (上海) 有限公司; 其他常规试剂均为国产分析纯; 水为超纯水。

1.4 仪器

XS105 型十万分之一电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); JA1003B 型千分之一电子天平 (上海越平科学仪器制造有限公司); SYNAPT G2-Si 型超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱联用仪、1401490S 型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); Nanodrop 2000 型微量核酸蛋白检测仪、CO₂ 培养箱 (美国赛默飞世尔科技公司); MLS-830L 型高压蒸汽灭菌器 (日本 PHCbi 公司) Veriti PCR 仪、ABI7500 型荧光定量 PCR 仪 (美国 Abi 公司); Axio Observer 3 型倒置荧光显微镜 (德国蔡司公司); Synergy H1 型多功能酶标仪 (美国伯腾公司); RE1600 型上皮细胞电压电阻仪 (北京金工鸿泰科技有限公司); ChemiDoc[™] Touch 型化学发光数字成像系统、垂直电泳及电转槽 (美国 Bio-Rad 公司); 5427R 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 CPE 冻干粉制备

取衢陈皮粗粉 (过 2 号筛) 适量, 加 10 倍量

水, 砂锅煎煮提取 3 次, 每次 1 h, 滤过、合并滤液、浓缩, 冷冻干燥后称定质量, 制得 CPE 冻干粉, 得率为 38.11%, -20°C 保存, 备用。

2.2 CPE 化学成分分析

2.2.1 供试品溶液制备 称取一定量的 CPE 用 80% 甲醇复溶, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 过 0.22 μm 滤膜, 即得生药质量浓度为 10 mg/mL 的供试品溶液。

2.2.2 混合对照品溶液制备 精密称取适量橙皮苷、新橙皮苷、桔皮素、川陈皮素、辛弗林对照品, 以 80% 甲醇配制含各成分 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.2.3 UPLC-Q-TOF-MSE 分析

(1) 色谱条件: Waters UPLC CORTECS T3 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.6 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~2 min, 5% B; 2~30 min, 5%~52% B; 30 min~32 min, 52%~100% B; 32~33 min, 100% B; 33~33.1 min, 100%~5% B; 33.1~35 min, 5% B。体积流量 0.3 mL/min; 检测波长为 254、286 nm; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 2 μL 。

(2) 质谱条件: Waters SYNAPT G2-Si 电喷雾离子源, 正、负离子电离模式下检测, MSE continue 全扫描模式, 扫描时间 0.2 s, 扫描范围 m/z 50~1 200; 低碰撞能量为 6 V, 高碰撞能量为 15~45 V; 亮氨酸脑啡肽实时质量校正。

2.2.4 数据处理 通过检索数据库建立陈皮化学成分库, 将原始数据导入 UNIFI V1.7 软件进行靶向分析, 设置质量偏差 $\pm (5.0 \times 10^{-3})$ 、保留时间容差 0.1 min, 结合对照品及文献比对确证化合物; 对未匹配成分采用 UNIFI V1.7 及 Masslynx 4.2 软件进行非靶向分析。

2.3 CPE 中主要黄酮类成分含量测定

2.3.1 供试品溶液制备 称取约 0.2 g CPE (相当于 0.5 g 陈皮粗粉), 加入水 50 mL 复溶, 称定质量, 超声 20 min (功率为 300 W、频率为 40 kHz), 放冷后加水补足质量, 过 0.22 μm 滤膜, 即得。

2.3.2 对照品溶液制备 精密称取适量芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素、桔皮素对照品, 以甲醇为溶剂, 制得芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素、桔皮素质量浓度分别为 6.96、130.50、61.08、14.63 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.3.3 色谱条件 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱

(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) - 0.1%甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~30 min, 95%~81% B; 30~40 min, 81%~80% B; 40~50 min, 80%~71% B; 50~85 min, 71%~46% B。体积流量 1.0 mL/min; 检测波长为 270 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。上述色谱条件参考李莉等^[12]的研究方法, 课题组前期研究已验证其可行性^[13]。方法学考察结果显示, 线性关系良好; 精密度试验 RSD 为 0.52%, 重复性试验 RSD 为 1.35%, 24 h 内稳定性试验 RSD 为 0.66%, 平均加样回收率为 96.06%, 均符合定量分析要求。

2.4 基于衢陈皮有效成分的网络药理学分析

通过 TCMSP (<https://www.tcmsp-e.com/>) 数据库筛选 CPE 活性成分 (口服生物利用度≥10%、类药性≥0.18), 利用 SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 平台预测成分靶点, 以“functional dyspepsia”为关键词从 GeneCards (<https://auth.lifemapsc.com/>) 和 OMIM (<https://omim.org/>) 数据库获取疾病靶点, 取交集获得潜在作用靶点。采用 STRING (<https://cn.string-db.org/>) 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 利用 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) 数据库进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。

2.5 CPE 对 FD 大鼠的治疗作用及肠道屏障的影响

2.5.1 动物分组、造模与给药

SD 大鼠 (7 日龄) 适应性喂养 3 d 后, 按体质量随机分为对照组 (12 只) 和造模组 (60 只), 雌雄各半。造模组于第 10 日龄起 ig 0.1%碘乙酰胺 (溶于 2%蔗糖溶液) 0.2 mL, 1 d/次, 连续 6 d; 对照组给予等体积 2%蔗糖溶液。大鼠 3 周龄时剔除母鼠分笼, 6 周龄时造模组隔日禁食 2 周, 建立 FD 模型。

造模结束 (8 周龄) 后, 将造模大鼠随机分为模型组、多潘立酮 (2.70 mg/kg) 组和 CPE 低、中、高剂量 (0.1、0.2、0.4 g/kg, 相当于生药量 0.27、0.54、1.08 g/kg) 组, 每组 12 只, 雌雄各半。各给药组连续 ig 给药 14 d, 1 次/d, 对照组和模型组给予等体积无菌水。给药期间自由进食饮水, 每日记录大鼠一般状态、体质量、进食量及饮水量。

2.5.2 标本采集

末次给药后, 大鼠禁食不禁水 24 h, 麻醉后腹主动脉取血, 分离血清, -80 °C 保存。剪

取胃及十二指肠组织, 部分以 4%多聚甲醛固定用于病理检测, 其余液氮速冻后-80 °C 保存备用。

2.5.3 胃排空率和小肠推进率检测

末次给药后, 所有大鼠禁食不禁水 24 h。每只大鼠 ig 碳糊 (3 g 羧甲基纤维素钠溶于 80 mL 蒸馏水中, 依次加入奶粉 5 g、蔗糖 4 g、淀粉 4 g、活性炭末 2 g, 搅拌均匀, 即得) 0.4 mL (即 0.46 g), 30 min 后麻醉处死, 分别取出胃和小肠, 计算胃排空率和小肠推进率。

胃排空率=1-(胃总质量-胃净质量)/ig 的碳糊质量

小肠推进率=幽门至碳糊前沿的距离/小肠总长度

2.5.4 胃肠组织病理学分析

各组胃及十二指肠组织经 4%多聚甲醛固定、石蜡包埋及苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色后, 通过数字扫描仪、K-Viewer 软件进行形态学观察。使用 Image J 软件测量十二指肠绒毛高度及隐窝深度, 并计算绒毛高度与隐窝深度比值。

2.5.5 ELISA 检测血清 LPS、DAO 及十二指肠 TNF-α 水平

各组随机取 6 只大鼠 (雌雄各半), 按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清 LPS、DAO 及十二指肠 TNF-α 水平。

2.5.6 qRT-PCR 检测十二指肠 TNF-α 的 mRNA 表达水平

提取十二指肠组织总 RNA, 逆转录为 cDNA。qPCR 反应以 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 为检测体系, 在实时荧光定量 PCR 仪上进行。每份样品重复 3 次, 以 GAPDH 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	种属	引物序列 (5'-3')
TNF-α	大鼠	F: CAGACCCTCACACTCAGATCAT R: GTTTGCTACGACGTGGGCTA
GAPDH	大鼠	F: GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG R: ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA
ZO-1	人	F: AACTGGGCTCTTGGCTTGCTATTC R: TCCAGAAGTCAGCACGGTCTCC
Occludin	人	F: ACAAGCGGTTTTATCCAGAGTC R: GTCATCCACAGGCGAAGTTAAT
Claudin-4	人	F: GGGGCAAGTGTACCAACTG R: GACACCGGCACTATCACCA
IL-6	人	F: GGCAGTGGCAGAAAACAACC R: GCAAGTCTCCTCATTGAATCC
TNF-α	人	F: CTCTCTCTAATCAGCCCTCTG R: GAGGACCTGGGAGTAGATGAG
GAPDH	人	F: CTGCCAACGTGTCACTGGGTG R: TCAGTGTAGCCCAGGATGCC

2.5.7 免疫组化法检测十二指肠 Occludin 蛋白表达 取十二指肠组织石蜡切片,经脱蜡水化、抗原修复、3%双氧水溶液避光孵育 25 min 及血清封闭后,滴加 Occludin 抗体(1:500)、二抗,DAB 显色,苏木素复染,于显微镜下观察并拍照后,使用 Image J 软件进行半定量分析。

2.6 细胞实验

2.6.1 细胞培养 Caco-2 细胞用含 10% FBS 和 1% 双抗的 DMEM 培养基,在 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中进行培养。细胞生长期间,每 2 d 更换 1 次培养基,并以 1:4 的比例进行传代。

2.6.2 肠道屏障损伤模型制备 取对数生长期的 Caco-2 细胞制成细胞悬液,调整细胞密度为 2×10^5 个/mL,接种于 24 孔 Transwell 板的小室(PET 膜,6.5 mm,孔径 0.4 μm)中,每室加液 0.2 mL;下室加入 0.8 mL 完全培养基。接种 24 h 后开始更换培养基:第 1 周,隔日更换 1 次上、下室培养基;第 2 周起,改为每日更换上室培养基,隔日更换下室培养基。培养 21 d 后,选取 TEER 值增加到 $500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上的成熟细胞单层,加入 20 ng/mL TNF-α 诱导 24 h 建立肠道屏障损伤模型。

2.6.3 MTT 法检测细胞存活率 将 Caco-2 细胞以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。随后,更换为含有不同剂量 CPE (0~240 μg/mL) 或橙皮苷 (0~400 μmol/L) 的无血清基础培养基,继续培养 24 h。处理结束后,吸弃培养基,每孔加入 100 μL 含 0.5 mg/mL MTT 的基础培养基,避光孵育 4 h。每孔加入 150 μL 二甲基亚砷溶解甲臞后,使用酶标仪在 570 nm 波长下测定吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.6.4 分组及给药 实验分为 6 组,均培养 24 h。对照组:Transwell 上室及下室加入基础培养基;屏障损伤模型组:上室加入基础培养基,下室加入含 20 ng/mL TNF-α 的基础培养基;CPE 低剂量组:上室加入含 120 μg/mL CPE 的基础培养基,下室加入含 20 ng/mL TNF-α 的基础培养基;CPE 高剂量组:上室加入含 240 μg/mL CPE 的基础培养基,下室加入含 20 ng/mL TNF-α 的基础培养基;橙皮苷低剂量组:上室加入含 50 μmol/L 橙皮苷的基础培养基,下室加入含 20 ng/mL TNF-α 的基础培养基;橙皮苷高剂量组:上室加入含 100 μmol/L 橙皮苷的基础培养基,下室加入含 20 ng/mL TNF-α 的基础培养基。

2.6.5 细胞 TEER 测定 在 Caco-2 细胞培养 21 d 后,用 PBS 洗涤 3 次,在对应孔上、下室加入不同处理组的培养液,干预 24 h,记算 12、24 h 的 TEER。

$$\text{TEER} = (\text{TEER}_{\text{样品}} - \text{TEER}_{\text{空白}}) \times A$$

TEER_{样品}为含有样品电阻;TEER_{空白}为不含细胞的空白电阻;A 为 Transwell 插孔内滤膜的有效表面积(cm²)

2.6.6 细胞旁通透性检测 通过 FD-4 外渗法测定 Caco-2 单层细胞旁通透性。吸弃培养基后,用 HBSS 洗涤 2 次,向上室中加入 1 mg/mL 的 FD-4 0.2 mL,6 h 后收集下室中的 100 μL 液体,采用酶标仪检测荧光强度(激发波长 490 nm,发射波长 520 nm)。

2.6.7 免疫荧光染色检测紧密连接蛋白表达与分布 细胞经 PBS 洗涤后,用预冷甲醇于-20 ℃固定 20 min。经 PBS 洗涤后,用 5% BSA 室温封闭 1 h。弃去封闭液,分别加入 50 μL ZO-1、Occludin 一抗(1:500,以 1% BSA 稀释),4 ℃孵育过夜。次日,经 PBS 洗涤后,加入 Alexa Fluor 488 标记的二抗(1:500,以 1% BSA 稀释),避光孵育 1 h。随后用 DAPI (1 μg/mL) 避光染核 5 min,将 Transwell 膜割下并封片,利用倒置荧光显微镜观察 ZO-1、Occludin 蛋白的分布与表达情况。

2.6.8 qRT-PCR 检测 ZO-1、Occludin、Claudin-4、IL-6、TNF-α 的 mRNA 表达水平 提取各组细胞总 RNA,逆转录为 cDNA。按“2.5.6”项下方法检测各目的基因的相对表达量。

2.6.9 ELISA 检测细胞上清液中 IL-6 水平 给药干预 24 h 后,收集上清液,3 000 r/min 离心 10 min,收集上清,按照 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-6 的水平。

2.6.10 Western blotting 检测 c-Src/Akt 通路相关蛋白表达 采用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,经 BCA 法定量并变性。取 30 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳后转至 PVDF 膜,用 5% BSA 封闭 1 h,分别加入 p-c-Src (1:2 000)、p-Akt (1:2 000)、GAPDH (1:10 000) 抗体,4 ℃孵育过夜。次日,加入 HRP 标记的二抗(1:10 000),室温孵育 1 h,显影成像。随后使用快速剥离缓冲液洗脱抗体并重新封闭,分别孵育 c-Src (1:2 000)、Akt (1:2 000) 抗体,进行二次显影。用 Image J 软件分析条带灰度值,以 p-c-Src/c-Src 和 p-Akt/Akt 值评价蛋白磷酸化水平。

2.7 统计学分析

数据结果经检验符合正态分布,采用 $\bar{x} \pm s$ 表

示,使用 GraphPad Prism 9.0.0 软件对实验数据进行差异显著性分析并绘图,数据采用 One-way ANOVA 或 Two-way ANOVA 进行统计学检验。

3 结果

3.1 CPE 化学成分分析

分析鉴定得到 CPE 化学成分共 84 个,其中 8 个为首次在陈皮中鉴定得到的化学成分(化合物 28、45、46、51、64、76、78、79)。CPE 中的化学成分以黄酮类为主,共 66 个,涵盖多种结构亚类:多甲氧基黄酮类数量最多,共 36 个,如川陈皮素、

桔皮素等;黄酮-C-糖苷类 11 个,如维采宁-2 等;黄酮-O-糖苷类 7 个,如橙皮苷、芸香柚皮苷等;黄烷酮类 10 个,涵盖黄烷酮-O-糖苷及其苷元,如橙皮素、多甲氧基黄烷酮等;简单黄酮类 2 个,为香叶木素和金圣草黄素。此外,还鉴定出柠檬苦素类 8 个,如黄柏酮、诺米林等;酚酸及有机酸类 7 个,如柠檬酸、绿原酸;以及生物碱辛弗林和环肽柑橘素 III、柑橘素 I。正、负离子模式下 CPE 总离子流图见图 1,混合对照品总离子流图见图 2,化合物具体信息见表 2。

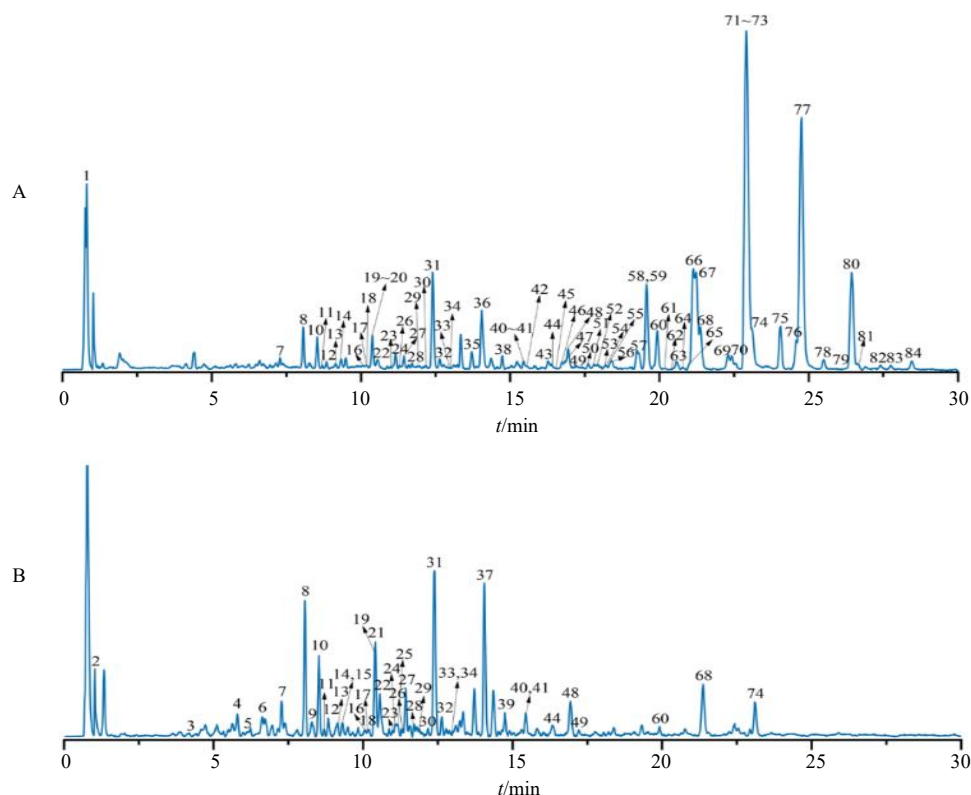


图 1 正 (A)、负 (B) 离子模式下 CPE 总离子流图

Fig. 1 Total ion current chromatogram of CPE in positive (A) and negative (B) ion modes

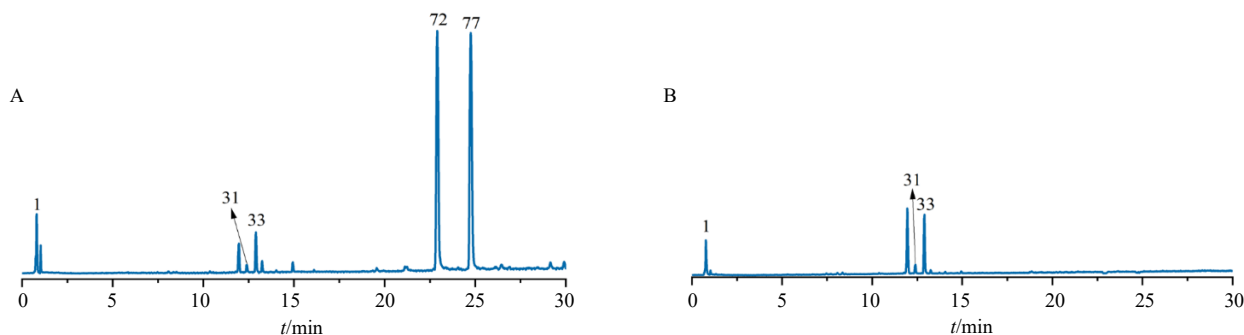


图 2 正 (A)、负 (B) 离子模式下混合对照品总离子流图

Fig. 2 Total ion current chromatogram of mixed standards in positive (A) and negative (B) ion modes

表 2 UPLC-Q-TOF-MSE 鉴定 CPE 中的化学成分

Table 2 Compounds in CPE identified by UPLC-Q-TOF-MSE

峰号	t_R/min	成分	分子式	正离子模式		负离子模式	
				实测值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	实测值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)
1 ^b	0.82	辛弗林	C ₉ H ₁₃ NO ₂	168.101 3	-3.8		
2	1.03	柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇			191.019 5	-1.0
3	4.42	咖啡酰葡萄糖	C ₁₅ H ₁₈ O ₉			341.083 6	-12.2
4	5.79	绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉			353.086 6	-3.3
5	6.18	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄			179.030 7	-23.8
6	6.63	2-(<i>E</i>)- <i>O</i> -阿魏酰- <i>D</i> -半乳糖二酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₁₁			385.077 2	-1.1
7	7.29	木犀草素-6,8-二- <i>C</i> -葡萄糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	611.161 2	0.9	609.147 2	1.8
8	8.07	维采宁-2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595.166 7	1.6	593.151 4	0.4
9	8.28	5- <i>O</i> -阿魏酰奎宁酸	C ₁₇ H ₂₀ O ₉			367.102 7	-2.0
10	8.53	金圣草黄素-6,8-二- <i>C</i> -葡萄糖苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	625.177 3	1.6	623.161 5	-0.4
11	8.71	野漆树苷-4'- <i>O</i> -葡萄糖苷	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	741.224 3	0.8	739.205 1	-5.4
12	8.85	木犀草素-2,4'-甲醚	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	625.177 0	1.1	623.163 0	2.0
13	9.17	异荭草苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.108 0	0.3	447.093 3	-0.1
14	9.32	荭草苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.108 2	0.9	447.093 2	-0.2
15	9.33	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄			193.047 3	-17.1
16	10.03	圣草次苷/新圣草次苷	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	597.181 6	0.3	595.166 8	0.0
17	10.16	牡荆素- <i>O</i> -木糖苷	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	565.150 0	-1.2	563.137 4	-5.7
18	10.19	芹菜素-8- <i>C</i> -葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433.112 9	0.0	431.097 9	-1.1
19	10.37	芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	611.162 6	3.2	609.146 5	0.7
20	10.38	柠檬苦素异构体	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	471.201 9	1.2		
21	10.41	柠檬苦素-17- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷	C ₃₂ H ₄₂ O ₁₄			649.250 2	0.1
22	10.58	忍冬苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595.166 8	1.8	593.151 1	-0.2
23	10.96	金雀花黄素	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	463.120 2	-7.1	461.108 1	-1.9
24	11.10	香叶木素-6- <i>C</i> -葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	463.123 5	0.1	461.108 2	-1.7
25	11.17	香叶木素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆			299.055 1	-3.3
26	11.30	香叶木素-8- <i>C</i> -葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	463.123 6	0.3	461.109 0	0.2
27	11.44	柚皮芸香苷	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	581.186 8	0.6	579.172 5	1.0
28 ^a	11.71	三甲氧基三羟基黄酮-7- <i>O</i> -葡萄糖苷	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	493.133 0	-2.2	491.119 2	-0.6
29	11.88	异鼠李素-3- <i>O</i> -芸香糖苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	625.179 9	5.1	623.162 2	0.7
30	12.18	香叶木苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	609.181 7	0.5	607.167 7	1.4
31 ^b	12.39	橙皮苷	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	611.197 8	1.3	609.182 9	0.7
32	12.64	5,3'-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	315.085 9	-1.4	313.070 8	-3.2
33 ^b	12.96	新橙皮苷	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	611.197 8	1.2	609.183 7	1.9
34	12.97	橙皮素	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	303.085 1	-4.1	301.067 6	-13.7
35	13.71	诺米林	C ₂₈ H ₃₄ O ₉	515.227 9	0.6		
36	14.04	诺米林酸	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₀	533.238 5	0.6		
37	14.05	诺米林酸-17- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷	C ₃₄ H ₄₈ O ₁₆			711.291 5	6.4
38	14.74	黄柏酮	C ₂₆ H ₃₀ O ₇	455.206 7	0.7		
39	14.75	黄柏酮-17- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷	C ₃₂ H ₄₂ O ₁₃			633.255 7	0.7
40	15.45	枸橼苷	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	595.202 8	1.1	593.189 0	2.5
41	15.45	异樱花素	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	287.090 7	-2.5	285.076 1	-2.6
42	15.52	7-羟基-3,5,6,8-四甲氧基黄酮	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	359.112 1	-1.1		
43	16.26	3-羟基-5,6,7-三甲氧基黄酮/3-羟基-5,7,8-三甲氧基黄酮	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	329.103 5	4.6		
44	16.39	咖啡酰-羟基-甲氧基黄烷酮- <i>O</i> -二糖苷	C ₃₇ H ₄₀ O ₁₈	773.225 3	-4.5	771.218 3	5.4
45 ^a	16.55	二羟基四甲氧基黄酮	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	375.107 0	-1.1		
46 ^a	16.75	单羟基三甲氧基黄酮	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	329.103 5	4.6		
47	16.83	7-羟基-5,6,8,4'-四甲氧基黄酮	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	359.112 6	0.3		
48	16.92	柑橘素III	C ₃₆ H ₅₃ N ₇ O ₉	728.401 7	5.4	726.387 4	5.8
49	17.23	金圣草黄素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301.070 1	-1.9	299.054 9	-4.2
50	17.62	4'-羟基-5,6,7,8-四甲氧基黄酮	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	359.111 6	2.5		
51 ^a	17.79	单羟基三甲氧基黄酮	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	329.103 5	4.6		
52	17.94	6-羟基-5,7,8,4'-四甲氧基黄酮/异构体	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	359.111 8	-1.9		
53	18.13	柚皮黄素-3- <i>O</i> -甲基戊二酸酯-β-葡萄糖苷	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₈	725.230 3	2.2		
54	18.20	4'-羟基-5,6,7,8,3'-五甲氧基黄酮	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	389.120 9	-5.6		
55	18.35	6-羟基-5,7,8,4'-四甲氧基黄酮/异构体	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	359.112 2	-0.8		

表 2 (续)

峰号	<i>t_R</i> /min	成分	分子式	正离子模式		负离子模式	
				实测值 (<i>m/z</i>)	误差 ($\times 10^{-6}$)	实测值 (<i>m/z</i>)	误差 ($\times 10^{-6}$)
56	18.40	5,6,7,3',4'-五甲氧基黄烷酮	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	375.140 9	-8.0		
57	19.25	7-羟基-5,6,8,3',4'-五甲氧基黄酮	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	389.120 9	-5.6		
58	19.54	柑橘素I	C ₃₄ H ₅₃ N ₇ O ₉	704.398 6	1.1		
59	19.57	异甜橙黄酮	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	373.127 8	-1.0		
60	19.92	3'-羟基-5,6,7,8,4'-五甲氧基黄酮	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	389.120 9	-5.6	387.107 9	-0.3
61	20.10	8-羟基-3,5,6,7,3',4'-六甲氧基黄酮	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	419.132 8	-2.1		
62	20.48	7-羟基-3,5,6,8,3',4'-六甲氧基黄酮	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	419.133 2	-1.1		
63	20.57	5,7,3',4'-四甲氧基黄酮	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	343.119 0	4.1		
64 ^a	20.82	单羟基六甲氧基黄酮	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	419.133 6	0.0		
65	20.99	5-羟基-7,8,3',4'-四甲氧基黄酮	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	359.112 1	-1.1		
66	21.13	甜橙黄酮	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	373.127 9	-0.8		
67	21.23	5,6,7,4'-四甲氧基黄酮	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	343.117 1	-1.6		
68	21.37	柠檬苦素	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	471.201 7	0.7	469.185 0	-2.7
69	22.31	5,6,7,8,3',4'-六甲氧基黄烷酮	C ₂₁ H ₂₄ O ₈	405.154 0	-0.9		
70	22.43	4',8-二羟基-3,5,6-三甲氧基黄	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	345.096 5	-1.2		
71	22.82	川陈皮素异构体	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	403.139 0	0.5		
72 ^b	22.94	川陈皮素	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	403.138 3	-1.1		
73	22.99	5,7,8,4'-四甲氧基黄酮	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	343.116 7	-2.7		
74	23.12	3,5-二羟基-4',6,7,8-四甲氧基黄酮	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	375.107 0	-1.3	373.092 7	-0.6
75	24.05	3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮	C ₂₂ H ₂₄ O ₉	433.149 2	-0.2		
76 ^a	24.58	单羟基四甲氧基黄酮	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	359.112 0	-1.4		
77 ^b	24.75	桔皮素	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	373.127 8	-1.1		
78 ^a	25.50	单羟基四甲氧基黄酮	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	359.112 7	0.0		
79 ^a	26.26	六甲氧基黄酮	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	403.138 3	-1.0		
80	26.44	5-羟基-6,7,8,3',4'-五甲氧基黄酮	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	389.129 5	16.4		
81	26.65	5-羟基-7,3',4'-三甲氧基黄酮	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	329.103 0	4.6		
82	27.41	5-羟基-3,4,3',4',5',6'-六甲氧基黄酮	C ₂₁ H ₂₄ O ₈	405.153 4	-2.3		
83	27.75	柚皮黄素	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	419.133 5	-0.3		
84	28.46	栀子黄素B	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	359.111 9	-2.4		

a 为首次在陈皮中鉴定出的成分, b 为与对照品比较后确定的成分。
a is a component first identified in *Citri Reticulatae Pericarpium*, and b is a component confirmed by comparison with reference standard.

3.2 CPE 中主要黄酮类成分含量

CPE 中 4 种主要黄酮类成分(芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素、桔皮素)的质量分数分别为 5.60、26.65、4.60、0.22 mg/g。其中,橙皮苷的含量占主导地位,芸香柚皮苷、川陈皮素次之,而桔皮素为微量成分。

3.3 基于衢陈皮有效成分的网络药理学分析

通过 TCMSP 数据库筛选得到 CPE 活性成分 18 种,去重后有效成分 15 种,分别为橙皮苷、桔皮素、甜橙黄酮、枸橼苷、黄柏酮、诺米林、新橙皮苷、异甜橙黄酮、异荛草苷、橙皮素、香叶木苷、香叶木素、绿原酸、5,6,7,3',4'-五甲氧基黄烷酮、5,7,8,4'-四甲氧基黄酮,对应靶点共 336 个;从 GeneCards 和 OMIM 数据库获取 FD 疾病靶点 2 043 个。如图 3-A、B 所示,取交集获得潜在作用靶点 171 个,构建“活性成分-靶点-疾病”网络。如图 3-C、D 所示,PPI 网络分析显示,核心靶点包括 SRC、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 α

(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha, PIK3CA)、磷酸肌醇-3-激酶调节亚基 1 (phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1, PIK3R1)、AKT1、HRas 原癌基因(HRas proto-oncogene, HRAS)及雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1)等,提示这些靶点可能为 CPE 治疗 FD 的关键节点。

如图 3-E 所示,GO 功能富集分析表明,生物学过程(biological process, BP)主要涉及胰岛素样生长因子受体信号通路、细胞增殖调控、凋亡负调控及磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/Akt 信号转导的正调控信号通路;细胞组成(cellular composition, CC)主要富集于质膜及受体复合物;分子功能(molecular function, MF)主要涉及三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)结合及蛋白激酶活性。如图 3-F 所示,KEGG 通路富集分析显示,交集靶点显著富集于胰岛素样生长因子受体信号通路、胰岛素受体信号通路、平滑肌细



A-CPE 活性成分靶点与 FD 疾病靶点交集图; B-“活性成分-靶点-疾病”网络图; C-CPE 与 FD 共同靶点; D-PPI 网络图; E-GO 富集分析气泡图; F-KEGG 通路富集分析气泡图。

A-intersection of active ingredients' targets of CPE and FD disease targets; B-“active ingredient-target-disease” network diagram; C-common targets of CPE and FD; D-PPI network diagram; E-bubble plot of GO enrichment analysis; F-bubble plot of KEGG pathway enrichment analysis.

图 3 CPE 治疗 FD 的网络药理学分析

Fig. 3 Network pharmacology analysis of CPE for treating FD

胞增殖的正调控、细胞外调节蛋白激酶 1 (extracellular signal-regulated kinase 1, ERK1)/ERK2 级联的正调控、PI3K/Akt 信号转导的正调控、表皮生长因子受体信号通路、血小板衍生生长因子受体信号通路、血管内皮生长因子受体信号通路、蛋白

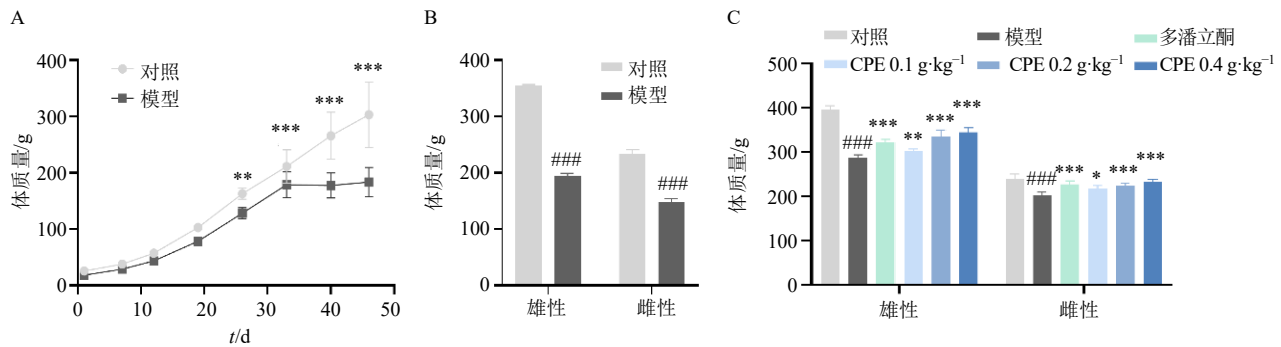
磷酸化及凋亡负调控等通路。上述结果提示, CPE 可能通过调控 c-Src/Akt 等信号通路, 促进平滑肌细胞功能、改善胃肠动力, 上调紧密连接蛋白表达、修复十二指肠机械屏障并减轻局部炎症, 从而发挥对 FD 的治疗作用。

3.4 CPE 对 FD 大鼠的治疗作用及肠道屏障的影响

3.4.1 CPE 对 FD 大鼠体质量的影响 如图 4-A、B 所示,造模期间,模型组雄性及雌性大鼠自造模第 26 天起体质量增长速度均明显减缓,与对照组出现显著差异 ($P < 0.01$),至造模结束时(第 46 天)体质量极显著低于对照组 ($P < 0.001$)。上述结果表明,碘乙酰胺刺激联合不规律进食,成功诱导了 FD 大鼠的生长抑制与营养障碍。如图 4-C 所示,给药 14 d 后,与模型组比较,各给药组雄性及雌性大鼠体质量均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001),提示

CPE 可有效缓解 FD 所致体质量增长抑制,并呈剂量相关性。

3.4.2 CPE 对 FD 大鼠进食量和饮水量的影响 如图 5 所示,给药干预阶段(第 47~59 天),模型组大鼠进食量呈波动变化后低于对照组,饮水量持续低于对照组;与模型组比较,各给药组大鼠进食量和饮水量均有不同程度改善,其中 CPE 高剂量组恢复效果最明显,整体接近多潘立酮组。表明 CPE 能有效缓解 FD 大鼠的早饱与食欲减退,促进一般生理机能恢复。



A-造模期间大鼠体质量生长曲线; B-造模结束时大鼠体质量; C-给药结束后大鼠体质量; 与对照组比较: $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$ $^{\#\#\#}P < 0.001$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$, 下同。

A-growth curves of body weight of rats during modeling; B-body weight of rats at end of modeling; C-body weight of rats after administration; $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$ $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 4 各组大鼠体质量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Body weight of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

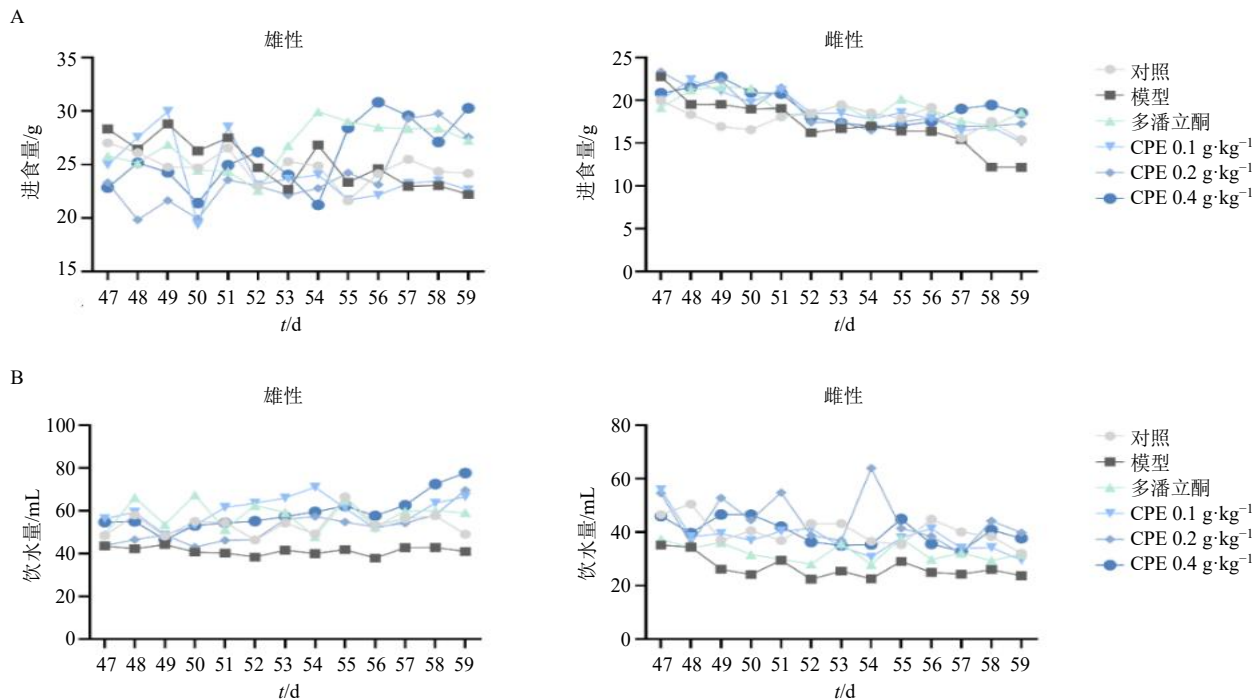


图 5 各组大鼠实验期间的进食量 (A) 和饮水量 (B) ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Food intake (A) and water intake (B) of rats in each group during experiment ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.4.3 CPE 对 FD 大鼠胃排空率和小肠推进率的影响 如图 6 所示,与对照组比较,模型组雄性 & 雌性大鼠胃排空率和小肠推进率显著降低 ($P < 0.001$);与模型组比较,多潘立酮组 and CPE 中、高剂量组雄性 & 雌性大鼠胃排空率显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001),各给药组雄性 & 雌性大鼠小肠推进实验显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。表明 CPE 能

有效改善不同性别 FD 大鼠的胃排空延迟,并增强小肠推进能力,从而改善 FD 诱发的胃肠动力紊乱。

3.4.4 CPE 对 FD 大鼠胃组织病理学的影响 如图 7 所示,各组大鼠胃黏膜结构均保持完整,上皮细胞排列整齐,腺体形态正常,未见明显的黏膜糜烂、腺体萎缩及炎性细胞浸润。以上结果表明,本研究建立的 FD 模型大鼠胃组织未见明显器质性病变。

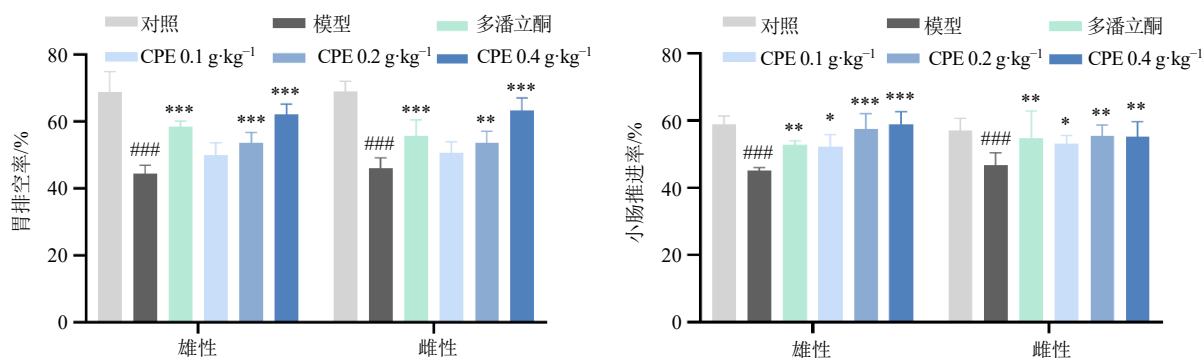


图 6 各组大鼠胃排空率和小肠推进率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Gastric emptying rate and intestinal propulsion rate of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

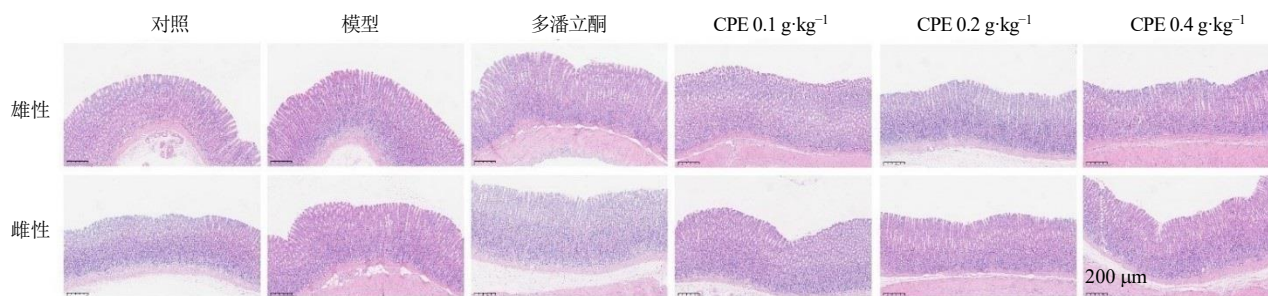


图 7 各组大鼠胃组织病理学变化 (HE, ×320)

Fig. 7 Gastric histopathology changes of rats in each group (HE, × 320)

3.4.5 CPE 对 FD 大鼠十二指肠组织病理学的影响 如图 8 所示,各组大鼠十二指肠黏膜均未出现明显的糜烂、溃疡、坏死等器质性病变现象。对照组大鼠十二指肠黏膜结构典型且完整,上皮层连续性良好,绒毛呈指状挺拔排列,长短均匀,杯状细胞丰富、分布规律。模型组大鼠绒毛高度缩短、形态变钝,断裂肥大较多,绒毛高度与隐窝深度比值显著降低 ($P < 0.05$),固有层内可见散在的炎性细胞浸润,杯状细胞数量减少、分布断续。经药物干预 14 d 后,各组黏膜损伤均得到不同程度的修复,绒毛形态明显恢复,其中 CPE 中、高剂量组雄性 & 雌性大鼠绒毛高度均明显回升,结构清晰,杯状细胞数量明显增加,已基本恢复至正常水平,绒毛高度与隐窝深

度比值较模型组显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)。以上结果表明, CPE 能有效修复 FD 大鼠十二指肠黏膜的损伤。

3.4.6 CPE 对 FD 大鼠血清中 LPS 和 DAO 水平的影响 在血清学指标方面, DAO 与 LPS 常被联合用于评价肠黏膜屏障功能,其水平升高可反映肠上皮损伤、通透性增加及内毒素移位^[14]。如图 9 所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中 LPS 和 DAO 水平显著升高 ($P < 0.001$);与模型组比较,各给药组大鼠血清中 LPS 和 DAO 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001)。表明 FD 大鼠出现了肠黏膜屏障损伤、通透性升高的现象, CPE 能有效减少 LPS 的易位和 DAO 的释放,从而修复受损的肠黏膜屏障。

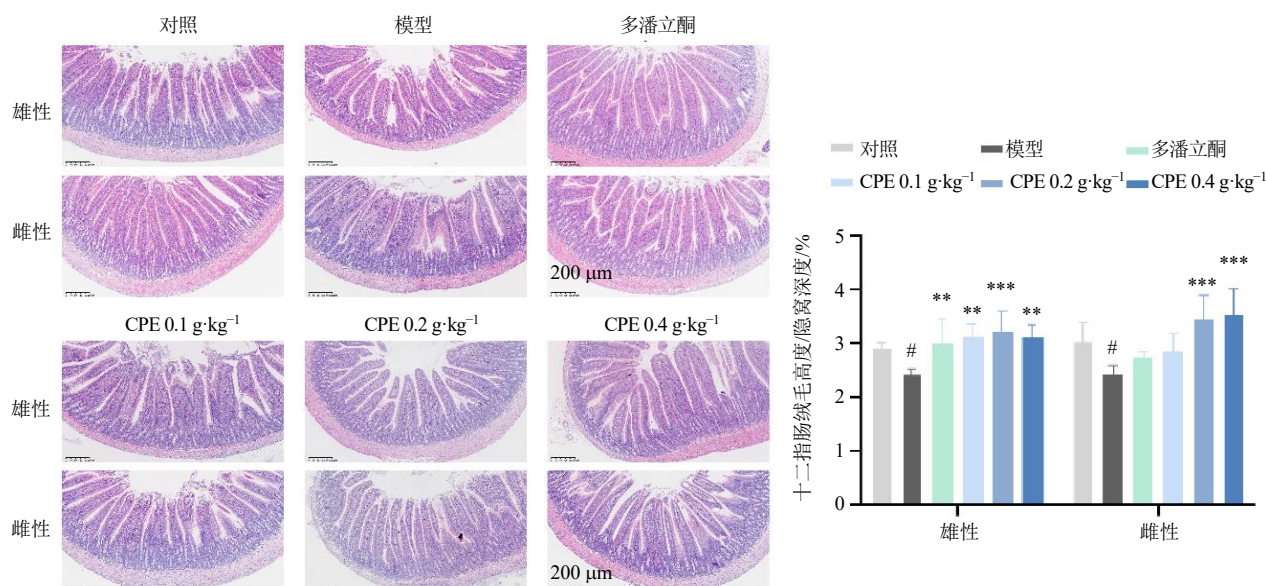


图 8 各组大鼠十二指肠组织病理学变化及十二指肠绒毛高度/隐窝深度值 (HE, $\times 320$; $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 8 Duodenal histopathology of rats in each group and villus height/crypt depth ratio of duodenum (HE, $\times 320$; $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

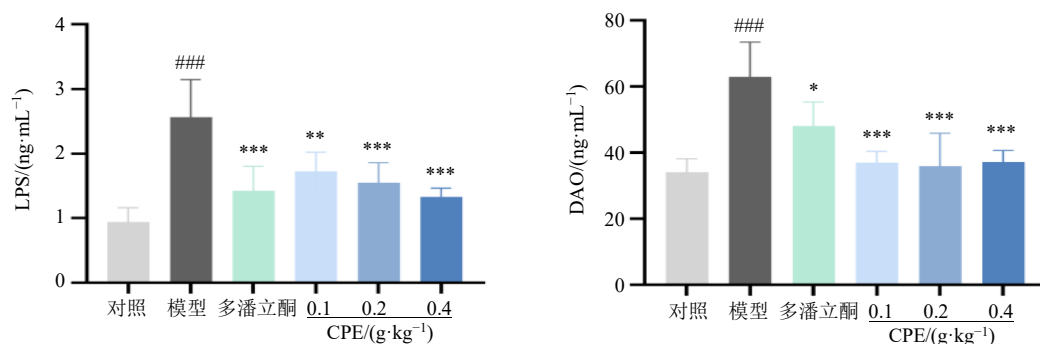


图 9 各组大鼠血清中 LPS 和 DAO 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 9 Levels of LPS and DAO in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.4.7 CPE 对 FD 大鼠十二指肠组织 TNF- α 蛋白及 mRNA 表达的影响 为进一步评估十二指肠黏膜的炎症状态, 采用 ELISA 和 qRT-PCR 检测 FD 大鼠十二指肠组织中 TNF- α 的蛋白及 mRNA 表达水平。如图 10 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠十二指肠组织中 TNF- α 的蛋白及 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组大鼠十二指肠组织中 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.001$), CPE 中、高剂量组十二指肠组织 TNF- α mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。

3.4.8 CPE 对 FD 大鼠十二指肠组织 Occludin 蛋白表达的影响 如图 11 所示, 对照组大鼠十二指肠黏

膜结构完整, Occludin 蛋白在绒毛、隐窝上皮细胞间呈强阳性表达, 表现为褐色阳性着色深且分布连续。与对照组比较, 模型组 Occludin 表达显著降低 ($P < 0.001$), 阳性着色减弱且稀疏, 染色呈浅褐色, 分布不连续, 表明 FD 模型大鼠肠道紧密连接蛋白发生了明显的物理降解与分布紊乱。与模型组比较, 各给药组 Occludin 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001), 褐色着色强度增强, 上皮细胞间分布趋于完整。以上结果提示, CPE 能够显著上调 FD 大鼠肠道 Occludin 蛋白表达, 并改善其在肠上皮细胞间的分布状态, 从而有效修复受损的肠道物理屏障功能, 提示其可能通过调控紧密连接蛋白重构发挥肠道保护作用。

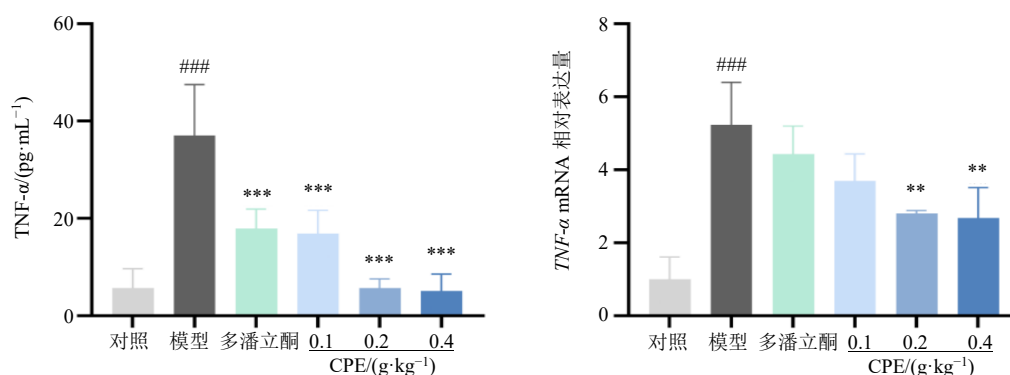


图 10 各组大鼠十二指肠组织 TNF-α 蛋白及 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 10 TNF-α protein and mRNA expression levels in duodenal tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

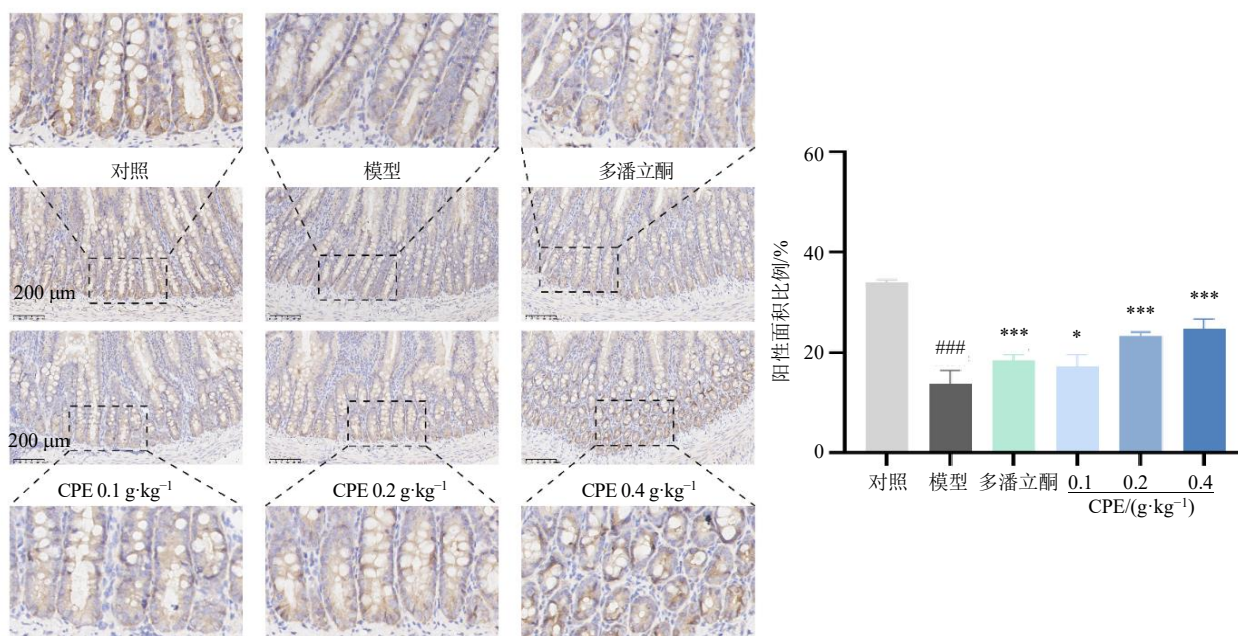


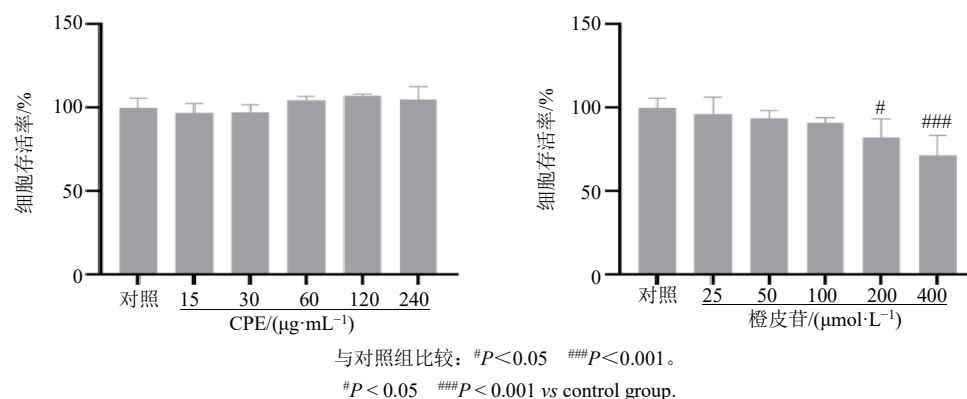
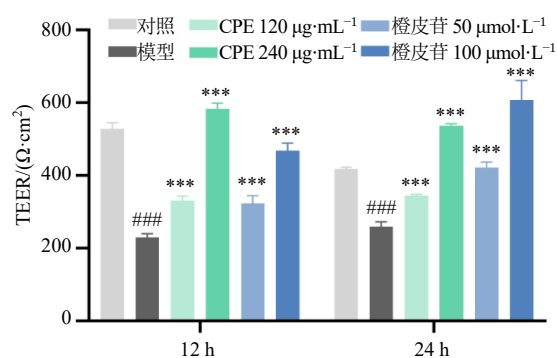
图 11 各组大鼠十二指肠组织中 Occludin 蛋白表达 ($\times 400; \bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Expression of Occludin in duodenal tissues of rats in each group ($\times 400; \bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 CPE 及橙皮苷对肠上皮细胞的屏障保护作用

3.5.1 CPE 及橙皮苷对细胞存活率的影响 如图 12 所示, 不同剂量 ($0 \sim 240 \mu\text{g}/\text{mL}$) 的 CPE 作用于 Caco-2 细胞 24 h 后, 细胞存活率无明显变化。随着橙皮苷剂量升高, 细胞存活率呈下降趋势, 在 200 、 $400 \mu\text{mol}/\text{L}$ 的橙皮苷作用下, 细胞存活率显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001)。以上结果表明, $0 \sim 240 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CPE 及 $0 \sim 100 \mu\text{mol}/\text{L}$ 的橙皮苷对 Caco-2 细胞无明显毒性作用。因此, 选择 120 、 $240 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CPE 和 50 、 $100 \mu\text{mol}/\text{L}$ 的橙皮苷作为低、高剂量用于后续实验。在上述安全性剂量范围内, 结合“3.2”项下含量测定结果可知, CPE (120 、 $240 \mu\text{g}/\text{mL}$) 组

所含橙皮苷的实际浓度分别为 5.24 、 $10.48 \mu\text{mol}/\text{L}$, 仅约为单体橙皮苷 (50 、 $100 \mu\text{mol}/\text{L}$) 组的 10.48% 。
3.5.2 CPE 及橙皮苷对 TNF-α 诱导的 Caco-2 细胞 TEER 的影响 TEER 是评价 Caco-2 细胞单层物理屏障功能与完整性的关键指标, 直接反映了细胞间紧密连接的严密程度。如图 13 所示, 与对照组比较, $20 \text{ ng}/\text{mL}$ TNF-α 处理细胞可导致其 TEER 值显著下降 ($P < 0.001$), 表明该处理成功模拟了炎症条件下肠道屏障紧密连接遭破坏的病理状态。在 TNF-α 刺激的同时加入不同剂量的 CPE 或橙皮苷进行干预, 均能显著抑制 TEER 值的下降 ($P < 0.001$), 但在作用时效与强度上呈现出不同的特点。

图 12 不同剂量 CPE 及橙皮苷对 Caco-2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Fig. 12 Effects of different concentrations of CPE and hesperidin on survival rate of Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)图 13 不同剂量 CPE 及橙皮苷对 TNF- α 诱导的 Caco-2 细胞 TEER 值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 13 Effects of different concentrations of CPE and hesperidin on TEER value in TNF- α -induced Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

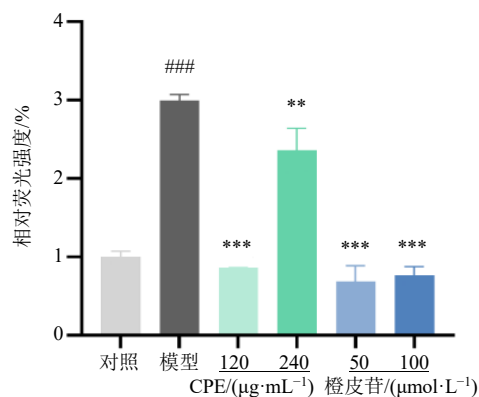
干预 12 h 时, 各给药组 TEER 值均显著高于模型组 ($P < 0.001$)。其中, CPE 高剂量组效果最强, 其 TEER 值甚至高于同期对照组水平。相比之下, 橙皮苷高剂量组虽也显著提升 TEER 值, 但其效果仍低于对照组。至干预 24 h 时, 各给药组仍保持较高的 TEER 值。橙皮苷的屏障保护效应持续增强, 其 TEER 值大幅度提升。而 CPE 的效果则保持稳定, 表现出良好的维持效应。以上结果表明, 陈皮和橙皮苷均能够显著拮抗 TNF- α 引起的 Caco-2 单层细胞 TEER 值下降, 增强细胞间紧密连接, 进而起到保护肠道屏障完整性的作用。但二者作用模式各异: CPE 在干预早期即表现出较强的保护作用, 而橙皮苷的保护作用则随给药剂量与干预时间的增加而逐步提升。

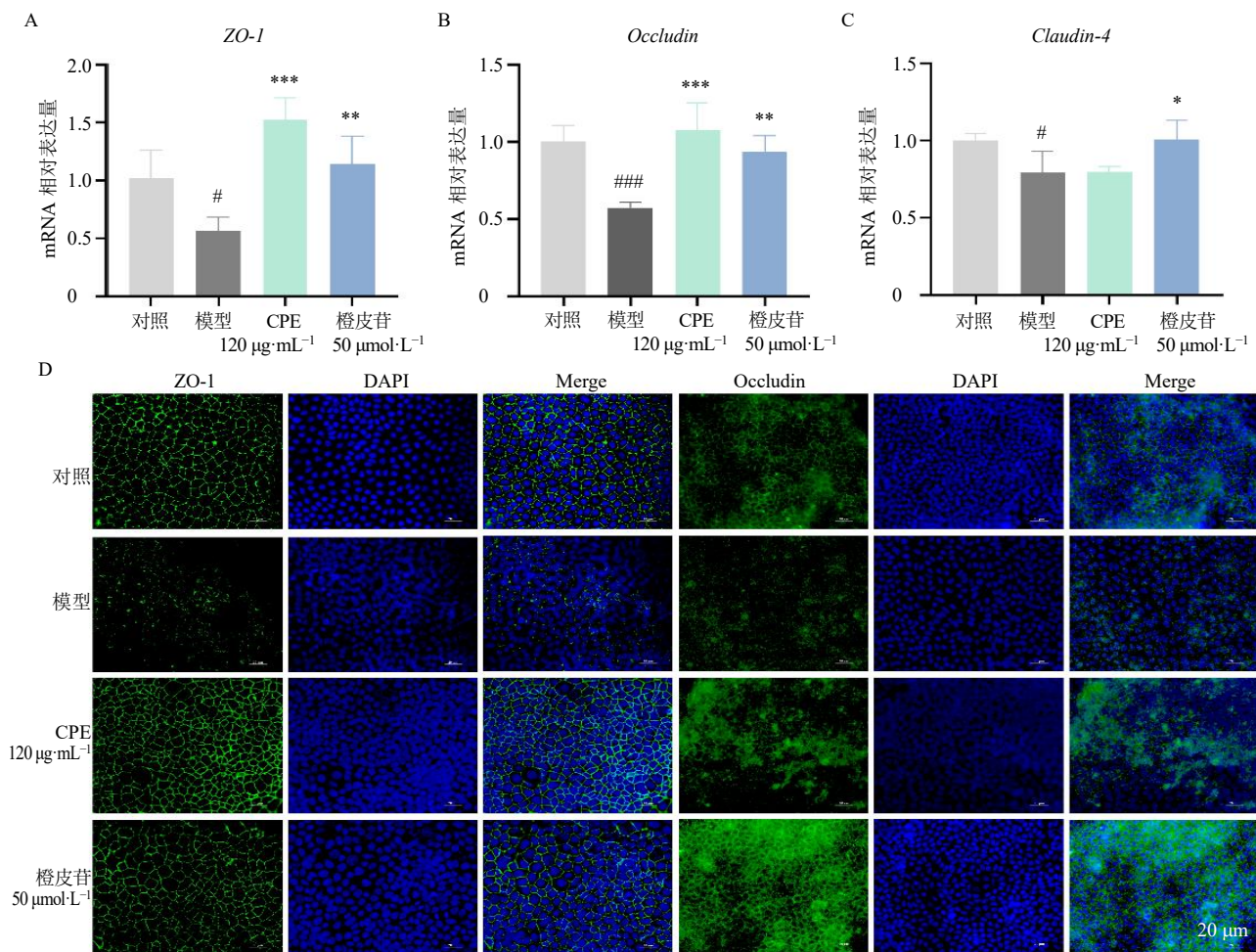
3.5.3 CPE 及橙皮苷对 TNF- α 诱导的 Caco-2 细胞旁通透性的影响 FD-4 作为评估细胞旁通透性的

经典探针, 其荧光强度与通过细胞单层的 FD-4 量成正比, 可定量反映细胞旁通透性水平。如图 14 所示, 对照组 FD-4 荧光值处于较低水平, 表明细胞间紧密连接结构较为完整。经 20 ng/mL TNF- α 处理细胞后, FD-4 荧光值显著升高 ($P < 0.001$), 提示紧密连接被破坏, 细胞旁通透性增强。与模型组比较, 各给药组 FD-4 荧光值均显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

基于 TEER 与 FD-4 通透性实验结果, 为进一步从分子层面揭示 CPE 整体与橙皮苷单体的作用差异, 选取功能学层面均表现出稳定保护效应的低剂量组进行后续机制探索。

3.5.4 CPE 及橙皮苷对 TNF- α 诱导的 Caco-2 细胞紧密连接基因表达和蛋白分布的影响 通过 qRT-PCR 检测各组紧密连接基因的表达, 结果如图 15-A~C 所示, 20 ng/mL TNF- α 处理显著下调 ZO-1、

图 14 不同剂量 CPE 及橙皮苷对 TNF- α 诱导的 Caco-2 细胞 FD-4 荧光值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 14 Effects of different concentrations of CPE and hesperidin on FD-4 fluorescence value in TNF- α -induced Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



D 图中标记目的蛋白为绿色荧光区域，细胞核为蓝色荧光区域。

Target protein in figure D is marked as a green fluorescent area, while nucleus is marked as a blue fluorescent area.

图 15 CPE 及橙皮苷对 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导的 Caco-2 细胞紧密连接基因表达 (A~C) 及蛋白分布 (D, $\times 400$) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 15 Effects of CPE and hesperidin on tight junction genes expressions (A—C) and protein distribution (D, $\times 400$) in $\text{TNF-}\alpha$ -induced Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Occludin 和 *Claudin-4* 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$ 、 0.001)；与模型组比较，CPE 低剂量组 *ZO-1*、*Occludin* 的 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.001$)，其提升幅度均优于橙皮苷低剂量组，但对 *Claudin-4* 的 mRNA 表达水平无显著调控作用；橙皮苷低剂量组 *ZO-1*、*Occludin* 和 *Claudin-4* 的 mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，呈现出较为均衡的转录调控模式。

对各组细胞的紧密连接蛋白 (*ZO-1*、*Occludin*) 进行免疫荧光染色，结果如图 15-D 所示，模型组表现出明显的细胞损伤特征：细胞核分布不规则且分散，紧密连接蛋白的绿色荧光信号断裂、缺失，形成不连续的网状结构，同时伴随细胞间隙增大，提示上皮屏障结构遭到破坏。对照组和各给药组细胞

核形态圆润、蓝色荧光清晰，*ZO-1* 与 *Occludin* 蛋白形成完整且荧光信号强烈的蜂巢状网络，紧密包裹细胞核，细胞间连接致密，间隙较小，反映出完好的细胞屏障形态。

3.5.5 CPE 及橙皮苷对 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导的 Caco-2 细胞炎症因子蛋白及 mRNA 表达的影响 为评估 CPE 对 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导的炎症反应的影响，检测下游炎症因子 IL-6 的分泌水平及其 mRNA 表达，同时观察 *TNF-}\alpha* mRNA 表达的变化。如图 16 所示，与对照组比较，模型组 IL-6 分泌和 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)；与模型组比较，各给药组 IL-6 分泌和 mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，表明 CPE 及橙皮苷均对 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导的 IL-6 分泌和表达有显著调节作用。此外，*TNF-}\alpha*

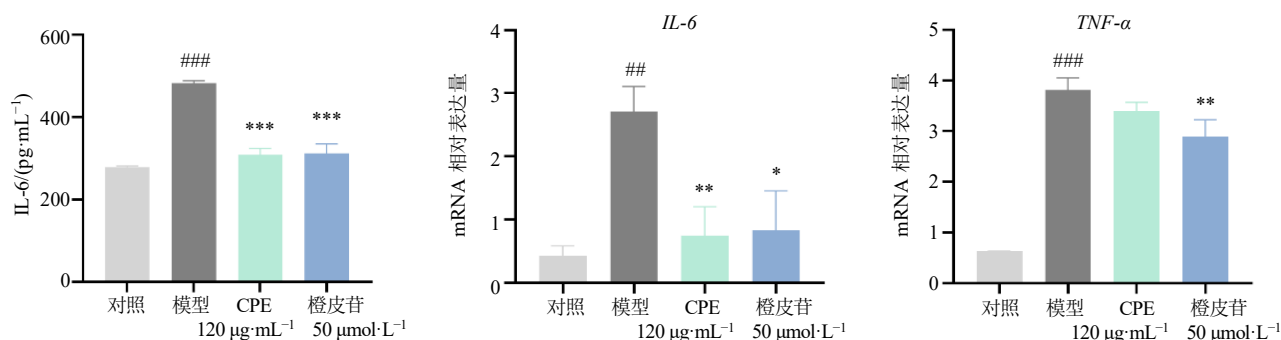


图 16 CPE 及橙皮苷对 TNF- α 诱导的 Caco-2 细胞炎症因子表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 16 Effects of CPE and hesperidin on expressions of inflammatory factors in TNF- α -induced Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

处理 24 h 后细胞中 TNF- α 的 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 橙皮苷低剂量组 TNF- α 的 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), CPE 低剂量组 TNF- α 的 mRNA 表达水平亦有下降趋势但无显著差异。

3.5.6 CPE 及橙皮苷对 TNF- α 诱导的 Caco-2 细胞 c-Src/Akt 通路相关蛋白表达的影响 通过 Western

blotting 检测各组细胞中 c-Src 和 Akt 蛋白及其磷酸化水平的变化, 结果如图 17 所示, 与对照组比较, TNF- α 诱导上调了 c-Src 和 Akt 的磷酸化水平, p-c-Src/c-Src 和 p-Akt/Akt 值均显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, CPE 干预能够下调 c-Src 和 Akt 的磷酸化水平, p-c-Src/c-Src 和 p-Akt/Akt 值均显著降低 ($P < 0.05$)。

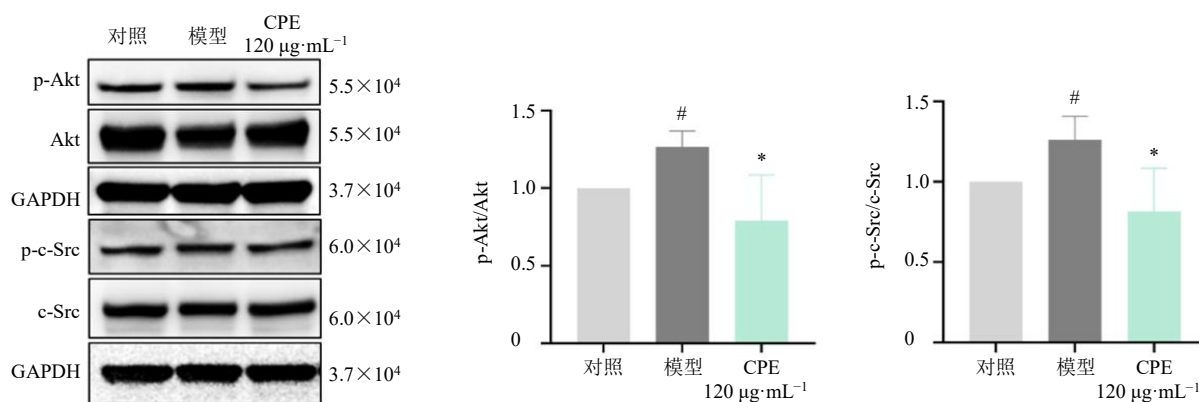


图 17 CPE 对 TNF- α 诱导的 Caco-2 细胞 c-Src/Akt 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 17 Effects of CPE on protein expressions related to c-Src/Akt signaling pathway in TNF- α -induced Caco-2 cells

($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

FD 是一种临床常见的胃肠道疾病, 其病理生理机制复杂, 涉及胃肠动力障碍、内脏高敏感性、肠黏膜屏障受损及低度炎症等多种因素^[15]。本研究明确了 CPE 的物质基础, 并进一步建立碘乙酰胺刺激联合不规律进食的 FD 大鼠模型及 TNF- α 诱导的 Caco-2 细胞肠道屏障损伤模型, 以探究 CPE 的药效与分子机制, 发现 CPE 显著改善 FD 大鼠的胃肠动力障碍, 增加胃排空率和小肠推进率, 恢复体质量及进食量、饮水量等宏观体征; CPE 可修复肠黏膜屏障, 体内表现为降低血清 LPS 与 DAO 水平、

上调十二指肠 Occludin 蛋白表达, 体外表现为抑制 TEER 值下降、降低 FD-4 通透性, 并恢复 ZO-1 和 Occludin 的连续网状分布; CPE 可抑制十二指肠及 Caco-2 细胞中 TNF- α 和 IL-6 的转录与分泌; CPE 显著下调 c-Src 和 Akt 的磷酸化水平; CPE 中橙皮苷含量仅为橙皮苷单体的 10.48%, 却在屏障保护与抗炎方面表现出等效甚至更优效果, 体现了多组分协同增效的特点。

网络药理学结果显示, CPE 的潜在靶点显著富集的通路为胃肠动力调节和肠屏障维护密切相关。其中, 胰岛素样生长因子-1 可通过 PI3K/Akt 通路

抑制胃平滑肌细胞凋亡, 并通过 ERK/丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路促进卡哈尔间质细胞存活与再生, 从而改善胃排空功能^[16-17]; 而 PI3K/Akt 通路不仅参与肠上皮细胞的存活与紧密连接蛋白的合成, 还调控炎症因子的释放^[18]。CPE 通过多靶点作用于这些通路, 一方面促进平滑肌的协调收缩以改善动力障碍, 另一方面维护上皮屏障的完整性, 从而实现了 FD 胃肠动力障碍与肠屏障损伤的同步干预。

十二指肠屏障功能受损是 FD 发病的关键环节之一。FD 患者存在十二指肠微炎症及上皮屏障结构破坏的病理表现^[19-21], 其黏膜中常可见肥大细胞及嗜酸性粒细胞浸润增加, 呈现低度炎症状态, 且炎症程度与肠道通透性及紧密连接蛋白表达改变显著相关^[22]。已有研究表明, TNF- α 可显著降低 Caco-2 细胞单层的 TEER 值, 增加细胞旁通透性, 并破坏紧密连接蛋白结构, 从而导致肠上皮屏障功能受损^[23], 这与 FD 患者表现出的 TEER 降低、细胞旁通路通透性增加及紧密连接等相关蛋白表达异常的症状相一致^[19]。屏障损伤又使肠腔抗原易于穿透黏膜, 进一步激发免疫反应和炎症放大。本研究证实, c-Src/Akt 通路正是这一恶性循环中的关键分子枢纽。已有研究证实, c-Src 可通过磷酸化 Occludin 调控其蛋白稳定性^[24], 也可通过介导 PEAK1 磷酸化保护 ZO-1 免受自噬降解^[25-26]。c-Src 可作为 Akt 的上游激酶, 磷酸化 PI3K 的调控亚基 (如 PIK3R1), 进而激活 Akt 信号^[27]; Akt 作为下游核心节点, 其过度磷酸化可进一步促进促炎因子合成^[28]。本研究中, TNF- α 刺激显著升高了 c-Src 和 Akt 的磷酸化水平, 而 CPE 干预能有效抑制这一变化, 提示其可能通过抑制 c-Src/Akt 信号通路的过度激活, 在结构上保护紧密连接蛋白, 同时在信号层面阻断炎症反应的级联放大, 阻断 FD 病理进程中“炎症”与“屏障损伤”的恶性循环。

本研究中, CPE 的整体屏障保护功效体现了多组分协同增效的特点。CPE 所含橙皮苷的物理剂量仅为橙皮苷单体组的 10.48%, 却在稳定 TEER、降低通透性及调控 ZO-1、Occludin、IL-6 mRNA 表达方面表现出与之相当甚至更优的效果。CPE 中除橙皮苷外, 还含有川陈皮素、芸香柚皮苷、桔皮素等多种活性成分, 已有研究证实这些成分可通过多靶点调控及信号通路互补产生协同效应^[29-31], 不同成分在吸收、分布、代谢和排泄过程中也可能相互促

进。此外, CPE 高剂量组对 FD-4 通透性的保护效果略弱于低剂量组, 提示其屏障保护作用可能存在非单调的剂量效应。这种协同效应与衢陈皮的独特性密不可分。衢州地区特有的水土气候和椪柑品种特性, 使衢陈皮中黄酮类成分的组成比例与其他产区存在差异, 但其现代药理学研究滞后, 本研究选用衢陈皮, 既基于其资源优势和产业前景, 也为道地药材的产业化开发与质量标准制定奠定了科学基础。本研究仍存在一定局限性, 未来将从以下几个方面重点开展: ①网络药理学预测的核心靶点及其上下游调控关系尚需通过特异性抑制剂干预等手段进一步验证; ②CPE 中除橙皮苷外的其他活性成分在屏障保护中的具体贡献及相互作用机制仍有待深入探讨。

综上, 本研究从化学成分分析、整体药效评价到机制验证, 系统阐释了 CPE 改善 FD 的作用机制。CPE 可显著改善 FD 大鼠的胃肠动力障碍与十二指肠黏膜屏障损伤, 并改善 TNF- α 诱导的 Caco-2 细胞屏障功能与炎症状态, 其核心在于通过调控 c-Src/Akt 信号通路修复肠黏膜屏障、抑制局部炎症反应, 且其整体效应体现了多组分协同增效的特点, 为衢陈皮在胃肠疾病中的应用提供了实验依据。

致谢: 浙江中医药大学中医药科学院药学科研究中心公共平台提供的技术协助。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈旻湖, 方秀才, 侯晓华, 等. 2022 中国功能性消化不良诊治专家共识 [J]. 胃肠病学, 2023, 28(8): 467-481.
- [2] 付郁, 单国顺, 尹爱凝, 等. 中西医结合治疗功能性消化不良研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(10): 82-85.
- [3] Vanheel H, Vicario M, Vanuytsel T, et al. Impaired duodenal mucosal integrity and low-grade inflammation in functional dyspepsia [J]. Gut, 2014, 63(2): 262-271.
- [4] Park J E, Park H Y, Kim Y S, et al. The role of diet, additives, and antibiotics in metabolic endotoxemia and chronic diseases [J]. Metabolites, 2024, 14(12): 704.
- [5] Haque M, Kaminsky L, Abdulqadir R, et al. *Lactobacillus acidophilus* inhibits the TNF- α -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability via a TLR-2 and PI3K-dependent inhibition of NF- κ B activation [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1348010.
- [6] Masuy I, Van Oudenhove L, Tack J. Review article: Treatment options for functional dyspepsia [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2019, 49(9): 1134-1172.

- [7] 朱正望, 王琳琳, 赵静涵, 等. 基于数据挖掘的功能性消化不良中医证型分布及用药规律研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2024, 35(9): 1437-1444.
- [8] 龙远雄, 徐寅, 邓桂明. 中医药治疗胃脘痛组方规律的数据挖掘研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(3): 405-410.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2025: 206.
- [10] Zhang X W, Jiang Y N, Zeng J S, *et al.* Phytochemistry, pharmacological properties and pharmacokinetics of *Citri Reticulatae Pericarpium*: A systematic review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 333: 118503.
- [11] 刘友平, 王福, 陈林, 等. 陈皮的产业发展策略 [J]. 中草药, 2026, 57(2): 689-710.
- [12] 李莉, 孙宜春, 庞媛媛, 等. 陈皮水提物指纹图谱的化学计量学分析及与糖尿病认知功能障碍的谱效关系 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(1): 147-154.
- [13] 胡晨霞, 金国明, 盛孝孝, 等. 多指标综合评价法优选衡产陈皮的干燥方法 [J]. 华西药学杂志, 2024, 39(2): 161-166.
- [14] Zhang R K, Chen Y N, Zhang J X, *et al.* Elevated serum levels of diamine oxidase, D-lactate and lipopolysaccharides are associated with metabolic-associated fatty liver disease [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2023, 35(1): 94-101.
- [15] 叶瑞银, 翟淑婷, 李勾玄, 等. 基于多组学的中医药治疗功能性消化不良作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(20): 7645-7656.
- [16] Lu Y F, Wei W, Chen H, *et al.* Investigating the role of IGF-1 in diabetic gastroparesis: A preliminary review [J]. *Acta Diabetol*, 2026, 63(1): 163-170.
- [17] An X X, Long C L, Deng X M, *et al.* Higenamine inhibits apoptosis and maintains survival of gastric smooth muscle cells in diabetic gastroparesis rat model via activating the β 2-AR/PI3K/Akt pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 95: 1710-1717.
- [18] Hu L, Yang Z, Zhang Y, *et al.* Sphingosine-1-phosphate alleviates colitis by regulating macrophage polarization and PI3K-Akt signaling [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1622094.
- [19] Puthanmadhom Narayanan S, O'Brien D R, Sharma M, *et al.* Duodenal mucosal barrier in functional dyspepsia [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2022, 20(5): 1019-1028.e3.
- [20] Wauters L, Li H, Talley N J. Editorial: Disruption of the microbiota-gut-brain axis in functional dyspepsia and gastroparesis: Mechanisms and clinical implications [J]. *Front Neurosci*, 2022, 16: 941810.
- [21] Zhou H H, Lu R H, Lv Y, *et al.* Alterations in gut microbiome and fecal metabolome in functional dyspepsia patients: Insights into pathophysiological mechanisms [J]. *Eur J Med Res*, 2025, 31(1): 149.
- [22] Wauters L, Ceulemans M, Schol J, *et al.* The role of leaky gut in functional dyspepsia [J]. *Front Neurosci*, 2022, 16: 851012.
- [23] Cui W, Li L X, Sun C M, *et al.* Tumor necrosis factor alpha increases epithelial barrier permeability by disrupting tight junctions in Caco-2 cells [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2010, 43(4): 330-337.
- [24] Lu Y Z, Zhou T, Xu C S, *et al.* Occludin is a target of Src kinase and promotes lipid secretion by binding to BTN1a1 and XOR [J]. *PLoS Biol*, 2022, 20(1): e3001518.
- [25] Zhang Z K, Xie Y J, Yi Q Y, *et al.* PEAK1 maintains tight junctions in intestinal epithelial cells and resists colitis by inhibiting autophagy-mediated ZO-1 degradation [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 6777.
- [26] Bouchard V, Demers M J, Thibodeau S, *et al.* Fak/Src signaling in human intestinal epithelial cell survival and anoikis: Differentiation state-specific uncoupling with the PI3K/Akt-1 and MEK/Erk pathways [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 212(3): 717-728.
- [27] Bouchard V, Harnois C, Demers M J, *et al.* B1 integrin/Fak/Src signaling in intestinal epithelial crypt cell survival: Integration of complex regulatory mechanisms [J]. *Apoptosis*, 2008, 13(4): 531-542.
- [28] Gayer C P, Chaturvedi L S, Wang S Y, *et al.* Delineating the signals by which repetitive deformation stimulates intestinal epithelial migration across fibronectin [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, 296(4): G876-G885.
- [29] Kerimi A, Williamson G. Differential impact of flavonoids on redox modulation, bioenergetics, and cell signaling in normal and tumor cells: A comprehensive review [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29(16): 1633-1659.
- [30] Yu S S, Liu K, Zhou F J, *et al.* Nobiletin from *Citrus reticulata* Blanco alleviates pulmonary fibrosis through inhibiting the PI3K/Akt pathway and epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 349: 119965.
- [31] Navajas-Porras B, Bosch-Sierra N, Valle C G, *et al.* Effects of a flavonoid-enriched orange juice on antioxidant capacity, lipid profile, and inflammation in obese patients: A randomized placebo-controlled trial [J]. *Food Res Int*, 2025, 217: 116759.

[责任编辑 李亚楠]