消痔丸对醋酸致肛门溃疡模型大鼠的作用机制研究

李新[1,2,3]，华永晨[4]，王春芳[1,2,3,5]，黄泽森[1,2,3,5]，韩彦琪[1,2,3]，赵专友[1,2,3]，许浚[1,2,3]，刘永姝[1,2,3,5]，郝泉[4]，姚鹏飞[1,2]，张铁军[1,2,3*]，柴国林[4*]

1. 天津药物研究院 天津市中药质量标志物重点实验室，天津 300462
2. 天津药物研究院 中药现代制剂与质量控制技术国家地方联合工程实验室 释药技术与药代动力学国家重点实验室，天津 300462
3. 天津药物研究院 药物成药性评价与系统转化全国重点实验室，天津 300462
4. 兰州佛慈制药股份有限公司，甘肃 兰州 730000
5. 天津中医药大学，天津 301617

摘 要：目的 探讨消痔丸对醋酸诱导大鼠肛门溃疡模型的药效作用及其可能的作用机制。**方法** 以醋酸诱导大鼠肛门溃疡模型，将造模成功大鼠分为模型组、消痔丸（0.81、1.62、3.24 g/kg）组、柑橘黄酮片（0.27 g/kg）组和痔炎消片（0.86 g/kg）组，另设置对照组，每组 10 只。对照组与模型组 ig 给予同等体积的 0.1% CMC-Na 溶液。各组连续 ig 给药 10 d，1 次/d。观察各组大鼠表观指标，并采用 Image J 软件计算溃疡面积；苏木素－伊红染色法观察肛门直肠组织病理学，并进行分级评分；酶联免疫吸附法（ELISA）检测大鼠肛门组织中基质金属蛋白酶-9（MMP-9）、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白细胞介素-6（IL-6）含量；免疫组化法检测肛门组织中诱导型一氧化氮合成酶（iNOS）、转化生长因子 β1（TGFβ1）、血管内皮生长因子 A（VEGFA）蛋白表达。**结果** 与模型组相比，消痔丸组可显著改善醋酸所致大鼠肛周溃疡、肿胀、黏液分泌等情况，加快大鼠肛周黏膜上皮修复，溃疡面积缩小，减少间质或黏膜下水肿及炎性细胞浸润和炎性渗出物；消痔丸组可抑制肛周组织中 MMP-9、IL-6、TNF-α 分泌和 iNOS、VEGFA 蛋白表达，增加 TGF-β1 表达（$P<0.05$、0.001）。**结论** 消痔丸对醋酸诱导的肛门溃疡模型治疗作用显著，主要通过抑制 IL-6、TNF-α、MMP-9 相关细胞因子分泌和 iNOS、VEGFA 蛋白表达，升高 TGF-β1 表达，从抗炎消肿、抑制基质降解、促进组织生长因子表达等途径，起到消肿生肌作用。

关键词：消痔丸；肛门溃疡；基质金属蛋白酶-9；肿瘤坏死因子-α；白细胞介素-6

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**1674 - 5515(2023)10 - 2410 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.10.005

Mechanism of Xiaozhi Pills on acetic acid-induced anal ulcer model rats

LI Xin[1,2,3], HUA Yong-chen[4], WANG Chun-fang[1,2,3,5], HUANG Ze-sen[1,2,3,5], HAN Yan-qi[1,2,3], ZHAO Zhuan-you[1,2,3], XU Jun[1,2,3], LIU Yong-shu[1,2,3,5], HAO Quan[4], YAO Peng-fei[1,2], ZHANG Tie-jun[1,2,3], CHAI Guo-lin[4]

1. Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China
2. National & Local United Engineering Laboratory of Modern Preparation and Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China
3. National Key Laboratory of Druggability Evaluation and Systematic Translational Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China
4. Lanzhou Foci Pharmaceutical Co., Ltd., Lanzhou 730000, China
5. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To explore the pharmacodynamic effect and possible mechanism of Xiaozhi Pills on acetic acid induced anal

收稿日期：2020-08-04

基金项目：国家自然科学基金重点资助项目（U21A20406）；兰州市人才创新创业项目（2022-RC-2）

作者简介：李新，女，硕士，助理研究员，研究方向为中药药理研究。E-mail: lix6@tjipr.com

***通信作者：**张铁军，研究员，主要研究方向中药新药开发及大品种二次开发。E-mail: zhangtj@tjipr.com

柴国林，正高级工程师，主要研究方向中药研发及中药质量控制。E-mail: 3136174195@qq.com

ulceration rat model. **Methods** Rats with acetic acid-induced anal ulcer model were divided into model group, Xiaozhi Pills (0.81, 1.62, 3.24 g/kg) group, Citrus Bioflavonoids Tablets 0.27 g/kg group and Zhiyanxiao Tablets 0.86 g/kg group, and control group with 10 rats in each group. Control group and model group were given the same volume of 0.1% CMC-Na solution by gavage. Each group was given ig for 10 days, once daily. The apparent indexes of rats in each group were observed, and the ulcer area was calculated by Image J software. The histopathology of anus and rectum was observed by hematoxylin-eosin staining and graded. The contents of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) in rat anal tissue were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), transforming growth factor β1 (TGFβ1) and vascular endothelial growth factor A (VEGFA) protein in anal tissues was detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the model group, Xiaozhi Pills can significantly improve the perianal ulcer, swelling, and mucus secretion induced by acetic acid, accelerate the repair of perianal mucosal epithelium, and reduce interstitial or submucosal edema, inflammatory cell infiltration and inflammatory exudate. Xiaozhi Pills group could inhibit the secretion of MMP-9, IL-6, TNF-α and the protein expression of iNOS and VEGFA in perianal tissue, and increase the expression of TGF-β1 (P < 0.05, 0.001). **Conclusion** Xiaozhi Pills has a significant therapeutic effect on acetic acid induced anal ulcer model, mainly by inhibiting the secretion of IL-6, TNF-α, MMP-9 related cytokines and the expression of iNOS and VEGFA protein, increasing the expression of TGF-β1, and playing a role in reducing swelling and promoting muscle growth through anti-inflammation and detumification, inhibiting matrix degradation, and promoting the expression of tissue growth factor.

Key words: Xiaozhi Pills; anal ulceration; MMP-9; TNF-α; IL-6

痔疮是一种非常普通的临床上常见的肛肠疾病，发病率较高，因其随时可以发作，严重影响人们的生活与健康。痔疮的病理特征是肛垫病理性肥大、移位及肛周皮下血管丛血流瘀滞形成的局部肿块，痔急性发作常表现为黏膜糜烂、疼痛、便血、红肿、渗出等，并伴有病变部位的感染。研究发现，创伤或炎症性因素可使各种细胞因子表达和活性增强，造成微血管壁及内皮细胞的损伤，不仅导致痔血管生成继续增加，还导致痔出血、水肿、脱出等临床症状，而增大和脱出的痔更易于发生创伤和炎症，从而形成痔发病中的恶性循环[1]。目前临床对早期痔疮主要治疗方法为非手术治疗（如内服、熏洗坐浴、外敷、激光等），从止痛、止血、抑制肿胀、促进溃疡愈合及抗炎等方面着手对痔疮进行有效治疗[2]。

消痔丸出自《疡医大全》，由地榆（炒炭）、牡丹皮、三颗针皮（炒炭）、大黄（酒炒）、黄芪、白及、槐角（蜜炙）、防己、白术（炒）、当归（酒炒）、火麻仁（炒黄）及动物大肠 12 味中药组成，具有消肿生肌、清热润便、补气固脱、止血、止痛的功效，主要用于痔疾肿痛、便秘出血、脱肛不收及肠风下血、积滞不化等症，主治痔疮。本研究采用醋酸建立大鼠肛门溃疡模型，进一步探讨消痔丸对溃疡愈合、抗炎消肿等方面的影响。

1　材料

1.1　药物和试剂

消痔丸由兰州佛慈制药股份有限公司生产，每 100 丸重 4 g，批号 210712；柑橘黄酮片由法国施维雅药厂生产，规格 500 mg（以总黄酮计），批号 2019224；痔炎消片由马应龙药业集团股份有限公司生产，规格 0.53 g/片，批号 220411。

冰醋酸（康科德公司，批号 210312）；BCA 蛋白浓度测定试剂盒（北京索莱宝科技有限公司，批号 20220806）；大鼠基质金属蛋白酶-9（MMP-9）ELISA 检测试剂盒（上海西唐生物科技有限公司，批号 2212261）；大鼠肿瘤坏死因子-α（TNF-α）ELISA 检测试剂盒（美国 Immunoway 公司，批号 KL04JH4L0322）；大鼠白细胞介素-6（IL-6）ELISA 检测试剂盒（美国 R&D Systems 公司，批号 900101）；转化生长因子 β1（TGFβ1）抗体（Affinity 公司，批号 20R6523）；诱导型一氧化氮合成酶（iNOS）抗体（Affinity 公司，批号 62Y7896）；血管内皮生长因子 A（VEGFA）抗体（Affinity 公司，批号 83M8093）；苏木素染色液（北京中杉金桥生物技术有限公司，批号 ZLI-9610）；伊红染色液（北京中杉金桥生物技术有限公司，批号 ZLI-9613）；兔二步法检测试剂盒（北京中杉金桥生物技术有限公司，批号 2228G1129）。

1.2　动物

SPF 级 SD 大鼠，5～6 周龄，体质量 180～200 g，大鼠由北京斯贝福生物技术有限公司提供，许可证号：SCXK（京）2019-0010，饲养在天津天诚新药评价有限公司实验动物屏障系统[合格证 SYXK（津）2021-0008]，温度、湿度、换气次数由中央系

统自动控制，温度维持在 20～26 ℃，相对湿度维持在 40%～70%，通风次数为 10～15 次/h 全新风，光照为 12 h 明、12 h 暗。自由摄食饮水，适应性喂养 1 周。实验动物的使用经天津天诚新药评价有限公司实验动物伦理委员会批准（IACUC：No.2022122302）。

1.3 仪器

SpectraMaxM5 酶标仪（美国 MolecularDevices 公司）；Sorvall ST 8R 高速冷冻离心机（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；WD-2103B 自动洗板机（北京六一生物科技有限公司）；Leica TP-1020 脱水机（徕卡仪器有限公司）；Leica HistoCore MULTICUT 病理切片机（徕卡仪器有限公司）；ES500-1 包埋机（金华市华速科技有限公司）；ES500-3H 组织摊片机（金华市华速科技有限公司）；Leica DM750 正置光学显微镜（徕卡仪器有限公司）；ICC50W 成像系统（徕卡仪器有限公司）。

2 方法

2.1 模型制备、分组及给药

取 SD 大鼠 80 只，除了对照组 10 只，其余大鼠采用浸有冰醋酸的 6 mm 滤纸片贴敷肛门，滤纸片需紧密接触肛门皮肤及黏膜，每只鼠用 3 片滤纸片，每片贴 30 s。6 h 后观察溃疡程度并于 24 h 后筛选模型成功的大鼠分为模型组、痔炎消片（0.86 g/kg）组、柑橘黄酮片（0.27 g/kg）组和消痔丸（0.81、1.62、3.24 g/kg）组，每组 10 只，每天 1 次，连续 ig 给药 10 d。对照组与模型组 ig 给予同等体积的 0.1% CMC-Na 溶液。

根据临床给药剂量以人体质量 70 kg 换算消痔丸大鼠等效剂量，即中剂量 1.62 g/kg，据此分别设置临床剂量 1/2 与 2 倍即低剂量组 0.81 g/kg 和 3.24 g/kg，同时分别根据阳性药痔炎消片、柑橘黄酮片临床给药剂量换算得出其大鼠给药剂量分别为 0.86 g/kg 和 0.27 g/kg。将以上药物研磨均匀后以 0.1% CMC-Na 溶液充分混悬按照 10 mL/kg ig 给药。

2.2 观察及检测指标

2.2.1 肛周形态及肛门溃疡面积 记录造模后（造模当天为 0 d）第 1、3、7、10 d 各组大鼠肛周溃疡、潮湿、焦痕、黏液等情况，并采用 Image J 软件对溃疡面积进行计算。评定标准按照表 1 进行[3-4]。

2.2.2 样品制备 末次给药 1 h 后，以 1%戊巴比妥钠麻醉，肛周脱毛，棉签置入肛门内作为指引，沿肛周环形分离肛门，深置直肠 5 mm 处，剪断直肠，移出标本，剔除周围结缔组织，纵剖，用冰冷生理盐水漂洗，滤纸吸干表面水分，将肛周及直肠组织分为 2 部分，一部分用于组织因子检测，另一部分组织用于病理学及组化检测。

表 1 表观指标分级标准

Table 1 Apparent index grading standard

分级	大便湿滞	便血	肛门潮湿	肛周肿胀	肛周溃疡	肛门瘀斑	肛门粘液	肛门焦痕
1	无	无	无	无	无	无	无	正常
2	可见	可见	轻度	轻度	轻度	轻度	较少	较多
3	较明显	较明显	较明显	较明显	较明显	较明显	较多	可见
4	明显	明显	明显	明显	明显	明显	较多	无

2.2.3 肛门组织病理学检测 取 2.2.2 项下 1/3 量肛门直肠组织，放入 10%甲醛溶液中固定，经脱水、包埋后切片，石蜡切片经脱蜡至水、苏木素－伊红染色后脱水封片，经显微镜镜检后采集图像进行分级评分：以大鼠肛周组织黏膜上皮和鳞状上皮细胞排列、增生、缺损，间质或黏膜下充血出血水肿，炎性渗出及坏死，炎细胞浸润和结缔组织增生为观察指标，依据病变程度和范围分为 5 个等级，正常 0 分，轻微 1 分，轻度 2 分，中度 3 分，重度 4 分。

2.2.4 肛门组织中 MMP-9、TNF-α、IL-6 含量 取 −80 ℃冻存的肛门组织适量，加入适量生理盐水匀浆至均匀、无明显组织块后 4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min，取上清按照试剂盒要求检测 MMP-9、TNF-α、IL-6 含量。

2.2.5 肛门组织 iNOS、TGF-β1、VEGFA 蛋白表达 收集肛门组织，放入 10%甲醛溶液中固定，将组织常规脱水、石蜡包埋、切片处理，按照免疫组化试剂盒操作分别以 iNOS、TGF-β1、VEGFA 抗体（1∶200）孵育后，经反应增强液、酶标聚合物、DAB 显色、苏木素复染后脱水封片，于显微镜下观察肛门组织中 iNOS、TGF-β1、VEGFA 的蛋白表达，iNOS、

TGF-β1、VEGFA 蛋白阳性表达呈棕黄色颗粒。利用 Image J 图像分析软件进行半定量分析，每组取 3 个样本进行实验，每张片子随机取 5 个高倍视野，测量每个视野中蛋白阳性染色区域面积，计算得到阳性染色区域面与总面积比值，即为 iNOS、TGF-β1、VEGFA 蛋白相对表达量。

2.3　统计学方法

采用 GraphPad Prism 7 进行数据分析，数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间差异性采用单因素方差分析。

3　结果

3.1　消痔丸对大鼠肛周溃疡的影响

对照组大鼠肛门回缩，肛内黏膜无损伤，肛周无水肿等异常情况。各组动物贴敷冰醋酸纸片后均出现白色溃疡面、肛周肿胀、黏液分泌增加、潮湿度显著增加等症状，随着时间推移，各组大鼠肛周溃疡会自行愈和，但给药组大鼠溃疡愈合速度明显加快，尤其在造模后第 7 d 时与模型组相比，消痔丸表观评分及溃疡面积明显降低（P＜0.05、0.01、0.001），至造模后第 10 d 时各给药组在溃疡面积和表观评分的治疗效果非常显著（P＜0.01、0.001），提示各给药组具有明显的抗醋酸诱导的肛门溃疡作用，见表 2、3。

3.2　消痔丸对大鼠组织病理的影响

肛门直肠组织的 HE 染色病理结果如图 1、表 4 所示，对照组大鼠肛周组织黏膜上皮和鳞状上皮细胞排列整齐，未见增生及缺损，间质或黏膜下层未见水肿，小血管扩张充血或出血，炎细胞不明显。模型组大鼠肛周黏膜上皮见脱落欠整齐，局部鳞状上皮层增厚，肛周组织黏膜上皮和鳞状上皮间见损伤区，其间上皮组织缺损，大量嗜中性粒细胞浸润

表 2　消痔丸对大鼠表观指标的影响（$\bar{x} \pm s$，n = 10）

Table 2　Effects of Xiaozhi Pills on apparent index in rats ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	表观指标评分			
		给药 1 d	给药 3 d	给药 7 d	给药 10 d
对照	—	8.00±0.00	8.00±0.00	8.00±0.00	8.00±0.00
模型	—	23.70±1.25***	23.60±0.70***	21.65±1.81***	19.80±1.49***
柑橘黄酮片	0.27	23.30±0.95	23.00±1.83	19.20±2.41$^{\#}$	16.70±3.16$^{\#}$
痔炎消片	0.86	23.20±1.62	23.20±1.03	18.70±1.38$^{\#\#}$	17.30±2.84$^{\#}$
消痔丸	0.81	23.50±0.85	22.20±2.04	19.10±1.41$^{\#}$	14.10±2.93$^{\#\#\#}$
	1.62	23.00±0.67	22.40±0.97$^{\#\#}$	18.65±2.07$^{\#\#}$	13.40±2.46$^{\#\#\#}$
	3.24	23.20±0.79	22.20±1.55$^{\#}$	18.05±1.95$^{\#\#\#}$	13.60±1.96$^{\#\#\#}$

与对照组比较：$^{***}P$＜0.001；与模型组比较：$^{\#}P$＜0.05　$^{\#\#}P$＜0.01　$^{\#\#\#}P$＜0.001

$^{***}P$ < 0.001 *vs* control group; $^{\#}P$ < 0.05　$^{\#\#}P$ < 0.01　$^{\#\#\#}P$ < 0.001 *vs* model group

表 3　消痔丸对大鼠溃疡面积的影响（$\bar{x} \pm s$，n = 10）

Table 3　Effects of Xiaozhi Pills on ulcer area in rats ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	溃疡面积/cm^2			
		给药 1 d	给药 3 d	给药 7 d	给药 10 d
对照	—	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型	—	1.10±0.31***	1.07±0.23***	0.81±0.17***	0.67±0.12***
柑橘黄酮片	0.27	1.01±0.14	0.79±0.09$^{\#\#\#}$	0.67±0.13	0.52±0.11$^{\#}$
痔炎消片	0.86	1.04±0.18	0.88±0.16$^{\#}$	0.74±0.16	0.50±0.12$^{\#\#}$
消痔丸	0.81	1.02±0.14	0.84±0.08$^{\#\#}$	0.67±0.11$^{\#}$	0.49±0.10$^{\#\#}$
	1.62	1.05±0.23	0.82±0.15$^{\#\#}$	0.62±0.11$^{\#\#}$	0.39±0.14$^{\#\#\#}$
	3.24	1.01±0.15	0.82±0.14$^{\#\#}$	0.63±0.08$^{\#\#}$	0.41±0.12$^{\#\#\#}$

与对照组比较：$^{***}P$＜0.001；与模型组比较：$^{\#}P$＜0.05　$^{\#\#}P$＜0.01　$^{\#\#\#}P$＜0.001

$^{***}P$ < 0.001 *vs* control group; $^{\#}P$ < 0.05　$^{\#\#}P$ < 0.01　$^{\#\#\#}P$ < 0.001 *vs* model group

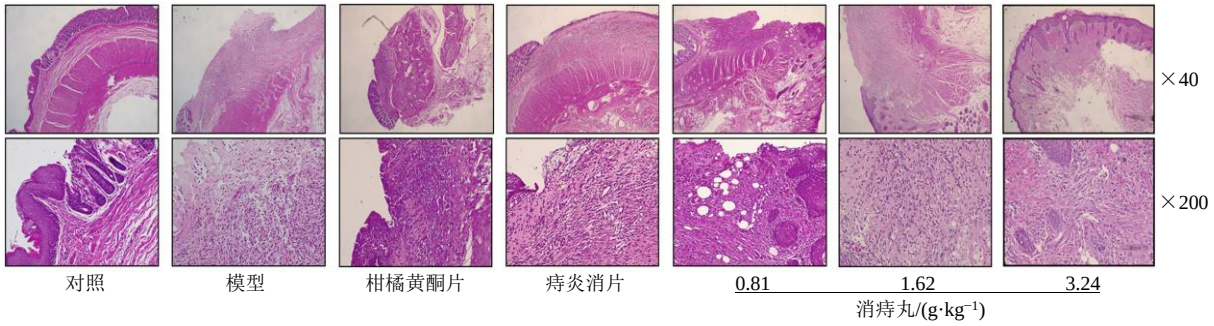

图 1 各组大鼠肛门直肠组织病理结果（HE 染色）

Fig. 1 Pathological results of anorectal tissue of rats in each group (HE staining)

表 4 消痔丸对醋酸诱导大鼠肛门溃疡模型病理形态学损伤评分的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 4 Effects of Xiaozhi Pills on histopathological damage score of acetic acid induced anal ulceration in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	病理评分
对照	—	1.33±0.58
模型	—	25.67±3.06***
柑橘黄酮片	0.27	15.33±1.15$^{\#\#}$
痔炎消片	0.86	20.67±3.06
消痔丸	0.81	17.67±3.79$^{\#}$
	1.62	14.00±1.73$^{\#\#\#}$
	3.24	14.67±1.15$^{\#\#\#}$

与对照组比较：$^{***}P$＜0.001；与模型组比较：$^{\#}P$＜0.05 $^{\#\#}P$＜0.01 $^{\#\#\#}P$＜0.001

$^{***}P < 0.001$ *vs* control group; $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$ $^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs* model group

并见炎细胞碎片，侵及黏膜下层或深部肌组织，见炎性渗出物及坏死组织，间质或黏膜下水肿，小血管扩张充血，见散在出血。结缔组织增生反应明显，损伤区累及周边组织。与对照组相比，模型组大鼠肛门直肠组织病理学评分显著提高（P＜0.001）。经消痔丸治疗后，大鼠肛周黏膜上皮脱落减少，有的甚至呈现修复完好，局部鳞状上皮层增厚明显减轻，肛周组织黏膜上皮和鳞状上皮见损伤区，其间上皮组织轻度缺损，缺损范围较模型组明显缩小，嗜中性粒细胞和淋巴细胞浸润减少，炎性渗出物，间质或黏膜下水肿和小血管扩张充血程度明显减轻，结缔组织增生也呈现轻中度反应。与模型组相比，消痔丸各给药组病理学评分显著降低（P＜0.05、0.001）。

3.3 消痔丸对大鼠肛门直肠组织中 MMP-9、IL-6、TNF-α 的影响

如表 5 所示，与对照组比较，模型组肛门直肠组织中 MMP-9、IL-6、TNF-α 含量显著增高（P＜0.001）。与模型组相比，消痔丸以及各给药组均可显著降低肛门组织中的 MMP-9、IL-6、TNF-α 含量（P＜0.001）。

3.4 消痔丸对大鼠肛门组织中 iNOS、TGF-β1、VEGFA 蛋白表达的影响

如表 6、图 2 所示，与对照组比较，模型组肛门直肠组织中 iNOS、VEGFA、TGF-β1 蛋白表达水平均显著增高（P＜0.001）。与模型组比较，各给药

表 5 消痔丸对醋酸诱导大鼠肛门溃疡模型肛门直肠组织中 MMP-9、IL-6、TNF-α 含量的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

Table 5 Effects of Xiaozhi Pills on anorectal tissue MMP-9, IL-6, and TNF-α on acetic acid induced anal ulceration in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	MMP-9/(ng·mL^{-1})	IL-6/(pg·mL^{-1})	TNF-α/(pg·mL^{-1})
对照	—	0.35±0.14	60.61±17.79	10.65±4.99
模型	—	1.79±0.65***	153.95±40.24***	30.00±5.79***
柑橘黄酮片	0.27	0.81±0.32$^{\#\#\#}$	76.09±34.51$^{\#\#\#}$	13.81±4.01$^{\#\#\#}$
痔炎消片	0.86	0.81±0.29$^{\#\#\#}$	70.73±23.75$^{\#\#\#}$	12.66±5.38$^{\#\#\#}$
消痔丸	0.81	0.83±0.46$^{\#\#\#}$	70.70±25.35$^{\#\#\#}$	14.65±4.75$^{\#\#\#}$
	1.62	0.61±0.18$^{\#\#\#}$	61.63±16.75$^{\#\#\#}$	9.97±1.65$^{\#\#\#}$
	3.24	0.57±0.27$^{\#\#\#}$	61.41±25.01$^{\#\#\#}$	9.77±4.01$^{\#\#\#}$

与对照组比较：$^{***}P$＜0.001；与模型组比较：$^{\#\#\#}P$＜0.001

$^{***}P < 0.001$ *vs* control group; $^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs* model group

表 6　消痔丸对醋酸诱导大鼠肛门溃疡模型肛门直肠组织中 iNOS、VEGFA、TGF-β1 蛋白表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

Table 6　Effects of Xiaozhi Pills on the expressions of iNOS, VEGFA and TGF-β1 protein in anorectal tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	iNOS 蛋白相对表达量	VEGFA 蛋白相对表达量	TGF-β1 蛋白相对表达量
对照	—	3.38±1.06	3.12±0.13	7.33±0.46
模型	—	23.82±0.50***	23.76±3.63***	15.53±0.65***
柑橘黄酮片	0.27	8.94±0.66$^{\#\#\#}$	9.48±0.92$^{\#\#\#}$	15.06±3.25
痔炎消片	0.86	9.06±1.29$^{\#\#\#}$	10.52±1.06$^{\#\#\#}$	11.05±2.99
消痔丸	0.81	10.09±1.10$^{\#\#\#}$	9.09±1.00$^{\#\#\#}$	15.36±1.05
	1.62	6.15±0.61$^{\#\#\#}$	6.34±0.52$^{\#\#\#}$	18.79±1.12$^{\#}$
	3.24	5.80±0.71$^{\#\#\#}$	6.12±1.73$^{\#\#\#}$	20.46±2.01$^{\#}$

与对照组比较：$^{***}P$＜0.001；与模型组比较：$^{\#}P$＜0.05　$^{\#\#\#}P$＜0.001

$^{***}P < 0.001$ *vs* control group; $^{\#}P < 0.05$　$^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs* model group

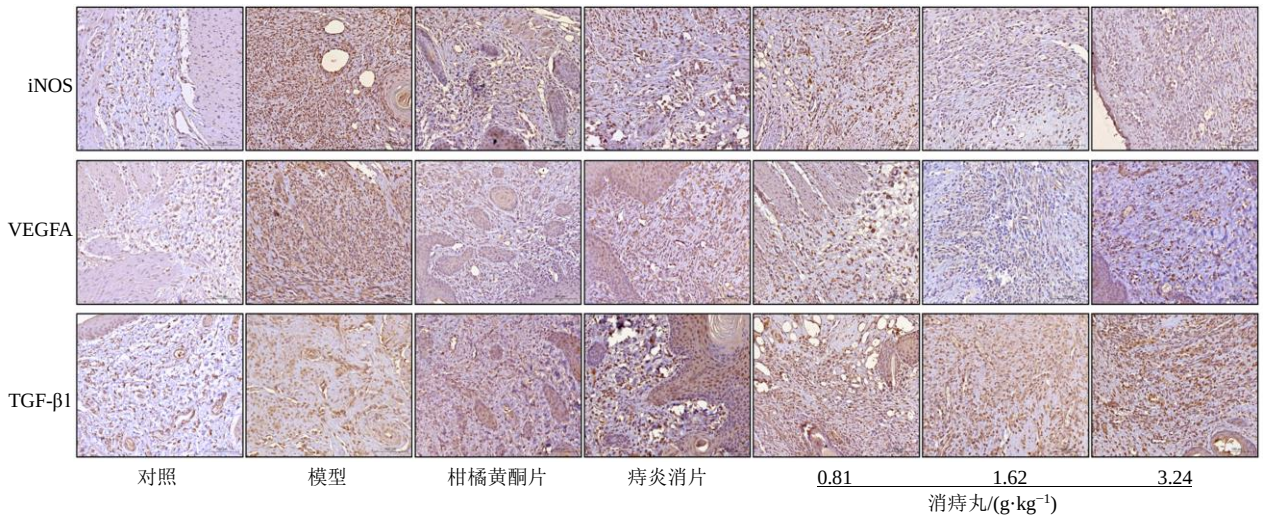

图 2　免疫组化检测各组大鼠肛门组织 iNOS、VEGFA、TGF-β1 蛋白表达（×400）

Fig. 2　Expressions of iNOS, VEGFA and TGF-β1 protein in anorectal tissue of rats in each group detected by immunohistochemistry (×400)

组可显著降低 iNOS、VEGFA 蛋白表达水平（P＜0.001），消痔丸 1.62、3.24 g/kg 组可进一步升高 TGF-β1 蛋白表达水平（P＜0.05）。

4　讨论

中医认为气血不调，络脉瘀滞，蕴生湿热是痔疮的成因，与饮食起居、久站久行、便秘腹泻、妊娠分娩、遗传，以及风、湿、瘀、热等外因有关。现代医学关于痔的病因及发病机制研究较多，如肛垫下移学说、静脉曲张学说、血管增生学说，但尚未取得一致结论。目前对痔组织的研究认为痔组织主要由受损后异常扩张的静脉血管组成，静脉内常见血栓形成，此外还常伴有炎性改变（如淋巴细胞、中性粒细胞、浆细胞等炎性细胞浸润）、水肿和充血等，造成肛肠黏膜损伤，表面可见溃疡形成[5]。消痔丸由 12 味药组成，方中地榆炭、白及、大黄等多味中药具有收敛固涩、消肿生肌等功效。现代药理研究发现，黄芪皂苷可抑制细胞间黏附分子 1（ICAM）、P-选择素的表达，降低 iNOS 的合成和谷胱甘肽的消耗，起到预防和治疗肠道溃疡性结肠炎的作用[6]；地榆炭凉血止血，研究发现鞣质和钙离子的增加可显著缩短凝血时间并促进血小板聚集，发挥止血作用[7]；槐角可下调 IL-6 水平，抑制一氧化氮（NO）和前列腺素 E_2（PGE_2）释放，抑制核因子 κB（NF-κB）核转位和细胞外调节蛋白激酶（ERK）磷酸化，表现出良好的抗炎活性；另外还可缩短断尾小鼠的出血时间和凝血时间，具有明显的促进止血和凝血作用[8]；酒大黄中没食子酸、大黄酚等成分可发挥收敛止血作用，大黄素、芦荟大黄

素等成分可发挥抗菌消炎作用，是有效对抗黏膜损伤和细菌感染的物质基础[9]；防己中的粉防己碱可通过抑制磷脂酶 A2（PLA2），阻止单核细胞和中性粒细胞中 PG 和白三烯的产生，对大鼠溃疡性结肠炎具有明确的改善作用[10]；白及可通过激活外源性、内源性凝血系统，调节 6-酮前列腺素 F1α（6-keto-PGF1α）、血栓素 B2（TXB2）水平，促进血小板聚集，发挥止血功能，还可通过下调 c-Jun 氨基末端激酶（JNK）及 p38 丝裂原活化蛋白激酶（p38-MAPK）基因和蛋白表达水平，抑制炎症因子 TNF-α、IL-1β 等异常分泌发挥黏膜保护、抗溃疡作用，另外还具有促进创伤愈合和抗菌作用[11]。

醋酸致肛门溃疡法可致局部红肿、炎性渗出、溃疡改变，与痔急性发作期表现的疼痛、便血、红肿、渗出、黏膜糜烂等症状较为相近，且有维持时间较长、可重复性较好等优点[12]，采用该模型可以从保护黏膜损伤、抗炎消肿等多个角度，评价药物“消肿生肌”的功效。因此，本研究采用醋酸贴敷法诱导大鼠肛周溃疡模型，对肛周组织的大体观察发现消痔丸可显著加速溃疡面的愈合，缓解红肿和炎性渗出。微观病理上可见大鼠肛周黏膜上皮脱落减少，局部鳞状上皮层增厚明显减轻，肛周组织黏膜上皮和鳞状上皮缺损范围较模型组明显缩小，嗜中性粒细胞和淋巴细胞浸润减少，炎性渗出物，间质或黏膜下水肿和小血管扩张充血程度明显减轻，提示消痔丸对醋酸诱导的肛门溃疡具有明显的改善作用。

痔病临床症状多表现为坠胀、便血、疼痛等，这与病变黏膜炎性水肿、血管损伤密切相关，而炎症因子和炎症细胞对炎症过程具有决定作用。TNF-α 是致炎作用最强、产生最快的炎症介质，一方面能够激活细胞 Ca^{2+}内流，释放血小板活化因子，促进血小板、淋巴细胞、白细胞黏附到肠黏膜的内皮细胞上，诱导 iNOS 生成，从而产生大量 NO，引起细胞损伤；另一方面 TNF-α 与 IFN-γ 的共同作用能够使肠上皮细胞的屏障功能及形态结构发生改变，进而增加肠黏膜和血管壁的通透性，最终破坏肠道黏膜的完整性，形成溃疡[13]。IL-6 通过转录激活因子 3 途径激活 NF-κB 信号通路而诱导细胞间黏附分子-1（ICAM-1）的极化表达，ICAM-1 激活信号转导通路，介导淋巴细胞之间、淋巴细胞与靶细胞之间的黏附，进一步促进炎性细胞的浸润，加重肠黏膜的组织损伤[14]。炎症因子能对痔血管壁及血管内皮造成氧化损伤，被氧化损伤的血管壁又不断产生炎症因子，形成恶性循环[15]。另外，局部炎症可能导致基质支架的扭曲和痔垫的滑动，也可损伤固有层的小动脉，导致排便时糜烂出血[16]。MMPs 能降解细胞外蛋白质，如弹性蛋白、纤维连接蛋白和胶原蛋白，研究发现 IL-1、TNF-α 和脂多糖等促炎细胞因子可特异性诱导 MMP-9 的上调，充分激活的 MMPs 可破坏毛细血管床，增加肛垫病理性移位和出血的风险[17-18]。本研究发现，消痔丸可显著降低肛周组织中 MMP-9、IL-6、TNF-α 含量，提示消痔丸可通过抑制炎症因子释放，有效减轻局部组织炎症水肿的发生。

正常的愈合过程是由多个细胞间信号的整合启动，包括角质形成细胞、成纤维细胞、内皮细胞、巨噬细胞、血小板等释放细胞因子和趋化因子。iNOS 主要在病理状态下由中性粒细胞、巨噬细胞产生，研究发现溃疡性结肠炎患者炎症黏膜上皮细胞 iNOS 表达率为 100%，黏膜固有层约半数炎性细胞表达 iNOS[19]，能催化合成 NO，而 NO 是调节血液循环、血小板活性、神经传递、免疫和炎症过程的关键因子，发挥炎性介质作用。TGF-β1 是重要炎性细胞趋化因子，可趋化成纤维细胞和炎症细胞向伤口聚集，促进成纤维细胞大量合成胶原蛋白，促进创面底部小血管的内皮细胞的增生、分裂，诱导肉芽组织生长和表皮形成，研究发现在胃溃疡愈合过程中，内源性 TGF-β1 表达呈由弱到强的表现[20]。VEGF 作用于血管内皮细胞和血管，参与炎症、损伤的修复，也是考察组织生长和创伤愈合的重要指标。在病理情况下，VEGF 含量增加可使毛细血管后静脉和小静脉的通透性增高而致使血液中的血浆蛋白、纤维蛋白、液体等外渗，导致周围间质水肿[21]。研究发现，痔组织水肿、出血的风险与 VEGF 阳性表达的增加呈正相关[22]。本研究发现，消痔丸可显著降低肛周直肠组织中 iNOS、VEGFA 阳性表达，升高 TGF-β1 阳性表达，提示消痔丸具有抑制炎症反应，促进溃疡愈合的作用。

综上所述，消痔丸通过抑制 IL-6、TNF-α、MMP-9 相关细胞因子分泌和 iNOS、VEGFA 蛋白表达，升高 TGF-β1 表达对醋酸诱导的肛门溃疡具有保护作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 王小青，高杨，马帅，等. 肾蕨对乙酸致小鼠肛门溃疡

的作用及 NF-κB, TNF-α, IL-1β 和 COX-2 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(8): 122-127.

[2] 刘苗苗, 李忠原, 丰茂秀, 等. 无花果叶提取物对痔疮及炎症动物模型作用效果 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(3): 1667-1670.

[3] 苗明三, 张梦飞, 田硕. 中药痔疮动物模型制备规范(草案)起草说明 [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(5): 212-215.

[4] 韩向晖, 陆金根, 曹永清, 等. 复黄片防治痔疮的药效学研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2008(5): 59-62.

[5] 吴琳琳, 刘朝阳, 田茂生, 等. 通过醋酸诱导大鼠肛肠黏膜损伤建立痔病模型的效果评价 [J]. 结直肠肛门外科, 2021, 27(1): 19-23.

[6] 刘爽. 黄芪药理作用的研究进展 [J]. 北方药学, 2015, 12(12): 95-96.

[7] 吴龙龙,徐昊阳, 张刘强, 等. 地榆化学成分及药理作用研究进展 [J]. 世界科学技术－中医药现代化, 2022, 24(1): 360-378.

[8] 徐兴楠, 笔雪艳, 宁夏, 等. 中药槐角有效成分、药理作用及炮制历史研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2021, 17(11): 206-212.

[9] 赵晓波. 大黄炮制方法对其药理作用影响 [J]. 医学理论与实践, 2020, 33(8): 1246-1247.

[10] 王蓉, 马腾茂, 刘飞, 等.防己的药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(4): 634-639.

[11] 左世梅. 药用植物白及化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国现代医生, 2021, 59(4): 189-192.

[12] 马宗国, 江南, 余梦瑶, 等. 痔疮动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(5): 446-450.

[13] 唐齐林, 周国华, 王为. TNF-α、IL-6 在炎症性肠病发病机制中的研究进展 [J]. 医学综述, 2014, 20(7): 1174-1176.

[14] Zhang F, Yao S, Zhang M, *et al*. Roles of circulating soluble interleukin (IL)-6 receptor and IL-6 receptor expression on $CD4^+$ T cells in patients with chronic hepatitis B [J]. *Int J Infect Dis*, 2011, 15(4): e267-e271.

[15] 刘超, 王振彪, 王垚, 等. 清热凉血解毒方对大鼠痔术后创面愈合及炎症因子表达的影响 [J]. 中国中医急症, 2020, 29(5): 837-840.

[16] Pata F, Sgró A, Ferrara F, *et al*. Anatomy, physiology and pathophysiology of haemorrhoids [J]. *Rev Recent Clin Trials*, 2021, 16(1): 75-80.

[17] Lohsiriwat V. Hemorrhoids: From basic pathophysiology to clinical management [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(17): 2009-2017.

[18] Bai X, Bai G, Tang L, *et al*. Changes in MMP-2, MMP-9, inflammation, blood coagulation and intestinal mucosal permeability in patients with active ulcerative colitis [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(1): 269-274.

[19] 徐进, 杜勇, 卢光新, 等. 复方甘草酸苷对 TNBS 结肠炎大鼠肠道炎症的影响 [J]. 胃肠病学, 2013, 18(4): 221-224.

[20] 舒晴, 谭永港, 邱猛进, 等. 转化生长因子β1在胃溃疡愈合过程中的表达及意义 [J]. 医学新知杂志, 2008, 18(6): 327-328.

[21] 张宏辉. 黄连解毒汤加减方对大鼠痔相近动物模型的影响及作用机制研究 [D]. 泸州: 西南医科大学, 2018.

[22] 韩炜, 王振军, 赵博, 等. 痔组织弹性纤维退变和血管生成的机制及其意义 [J]. 中华胃肠外科杂志, 2005(1): 56-59.

[责任编辑　高源]