

基于 4D-DIA 蛋白质组学的消痔丸治疗巴豆油诱导肛门肿胀类痔模型大鼠的作用机制

韩彦琪^{1,2}, 朱炜杰³, 朱雨晴⁴, 张 嫻^{1,2}, 许 浚^{1,2}, 赵专友^{1,2}, 柴国林^{3*}, 张铁军^{1,2*}

1. 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, 天津市中药质量标志物重点实验室, 中药现代制剂与质量控制技术国家地方联合工程实验室, 天津 300462
2. 和光中药科技(天津)有限公司, 天津 300462
3. 兰州佛慈制药股份有限公司, 甘肃 兰州 730000
4. 天津中医药大学, 天津 301617

摘要: 目的 利用四维数据非依赖性采集(4D-DIA)定量蛋白质组学技术研究消痔丸治疗巴豆油诱导肛门肿胀类痔模型大鼠的作用机制。方法 建立巴豆油诱导的大鼠肛门肿胀类痔模型, 采用 4D-DIA 非标定量蛋白质组学技术分析鉴定空白组、模型组、消痔丸 1.62 g/kg 组肛门直肠组织中的蛋白。以表达差异倍数 ≥ 1.2 或差异倍数 ≤ 0.83 且 $P < 0.05$ 筛选差异表达蛋白, 分析消痔丸显著干预的差异表达蛋白并对其进行基因本体(GO)功能富集分析和京都基因和基因组百科全书(KEGG)信号通路分析。通过 Western blotting、RT-qPCR 等实验手段验证消痔丸对 AMP 活化蛋白激酶(AMPK)/过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1- α (PGC-1 α)/核因子- κ B(NF- κ B)p65 信号通路的调控作用。结果 筛选出模型组与对照组大鼠肛门直肠组织的显著差异表达蛋白共 657 个, 消痔丸组与模型组显著差异表达蛋白共 105 个, 消痔丸对其中 38 个差异表达蛋白有显著干预作用。生物信息学分析发现消痔丸可干预 AMPK 信号通路、自噬、甘油磷脂代谢、花生四烯酸代谢、三羧酸循环、铁死亡、肿瘤坏死因子(TNF)等通路过程。动物实验表明, 与模型组比较, 消痔丸各剂量组肛门直肠组织中 PGC-1 α 、AMPK mRNA 表达显著升高, NF- κ B p65 mRNA 表达显著降低($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。与模型组比较, 消痔丸 1.62、3.24 g/kg 组肛门直肠组织中 p-AMPK/AMPK α 比值显著升高($P < 0.05$ 、0.01); 消痔丸各剂量组 PGC-1 α 表达显著升高, p-p65/p65 值显著降低($P < 0.01$ 、0.001)。结论 消痔丸通过调控 AMPK/PGC-1 α /NF- κ B p65 信号通路及花生四烯酸代谢, 发挥抗炎及调控能量代谢的生物活性。

关键词: 消痔丸; 痔疮; 蛋白质组学; 差异表达蛋白; 作用机制; AMP 活化蛋白激酶; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1- α ; 核因子- κ B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2026)07-1862-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.07.003

Mechanism of Xiaozhi Pills in treatment of croton oil-induced anal swelling hemorrhoids model rats based on 4D-DIA proteomics

HAN Yanqi^{1,2}, ZHU Weijie³, ZHU Yuqing⁴, ZHANG Xian^{1,2}, XU Jun^{1,2}, ZHAO Zhuanyou^{1,2}, CHAI Guolin³, ZHANG Tiejun^{1,2}

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

收稿日期: 2026-03-27

基金项目: 国有资本经营预算支持省属企业科研项目(2024GZ031)

作者简介: 韩彦琪, 副研究员, 研究方向为中药药效及作用机制研究。E-mail: hanyq@tjipr.com

*通信作者: 柴国林, 正高级工程师, 主要从事中药学研究。E-mail: 3136174195@qq.com

张铁军, 研究员, 主要从事中药新药研发及大品种培育。E-mail: zhangtj@tjipr.com

Abstract: Objective To study the mechanism of Xiaozhi Pills in treatment of croton oil-induced anal swelling hemorrhoids model rats by 4D-DIA non-standard quantitative proteomics technology. **Methods** The rat model of anal swelling hemorrhoids induced by croton oil was established. The 4D-DIA non-standard quantitative proteomics technique was used to analyze and identify the proteins in the anorectal tissues of the control group, the model group, and the Xiaozhi Pills 1.62 g/kg group. The differentially expressed proteins (DEPs) were screened by expression fold change ≥ 1.2 or ≤ 0.83 and $P < 0.05$. The DEPs significantly intervened by Xiaozhi Pills were analyzed, and GO function enrichment analysis and KEGG signal pathway analysis were carried out. Regulatory effect of Xiaozhi Pills on AMPK/PGC-1 α /NF- κ B p65 signaling pathway was verified by Western blotting, RT-qPCR. **Results** A total of 657 DEPs in anorectal tissues of rats in model group and control group were screened, and 105 DEPs in Xiaozhi Pills group and model group were screened. Xiaozhi Pills had a significant intervention effect on 38 DEPs. Bioinformatics analysis showed that Xiaozhi Pills could interfere with AMPK signaling pathway, autophagy, glycerophospholipid metabolism, arachidonic acid metabolism, tricarboxylic acid cycle, ferroptosis, TNF, and other pathways. Animal experiments showed that compared with the model group, the expression of PGC-1 α and AMPK mRNA in the anorectal tissues of each dose group of Xiaozhi Pills significantly increased, while the expression of NF- κ B p65 mRNA significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Compared with the model group, the ratios of p-AMPK/AMPK α in the anorectal tissues of the 1.62 and 3.24 g/kg groups of Xiaozhi Pills significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), the expression of PGC-1 α in each dose group of Xiaozhi Pills significantly increased, and the ratio of p-p65/p65 significantly decreased ($P < 0.01, 0.001$). **Conclusion** Xiaozhi Pills exerts anti-inflammatory and energy metabolism-regulating biological activities by regulating AMPK/PGC-1 α /NF- κ B p65 signaling pathway and arachidonic acid metabolism.

Key words: Xiaozhi Pills; hemorrhoids; proteomics; differentially expressed proteins; mechanism; AMPK; PGC-1 α ; NF- κ B

消痔丸（水蜜丸）为兰州佛慈制药股份有限公司独家品种，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，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。课题组前期药效研究表明，消痔丸能降低毛细血管通透性，减少渗出及水肿，缓解痔病发作期的红肿症状；能抑制血清及肛门直肠组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-6、前列腺素 E₂ (PGE₂)、一氧化氮 (NO) 等致炎致痛因子表达，减少炎症痛觉过敏，发挥清热止痛的疗效；能减轻炎性细胞浸润，抑制基质降解酶，促进组织修复因子表达，减轻肛门直肠黏膜局部糜烂，达到消肿生肌的治疗作用；能促进肠蠕动及肠液分泌，发挥润肠通便作用，缓解痔病便秘症状；能增强肛门内括约肌收缩，发挥固脱作用，达到防止痔疮脱出的疗效；止血作用显著，能有效缓解痔发作时的便血情况^[1-3]。

基于质谱的蛋白质组学技术在生物标志物发现、疾病机制研究及中药作用机制研究中具有广泛的应用前景^[4]。数据非依赖性采集 (4D-DIA) 技术能够对样品中的蛋白质进行超灵敏检测和定量，与传统的依赖性采集 (DDA) 相比，具有更高的数据采集效率、重现性和定量准确性^[5]。四维 (4D) 蛋白质组学在经典三维蛋白质组学的基础上增加

了离子淌度分离功能，具有更高的扫描速度和检测灵敏度。4D-DIA 结合了 4D 蛋白质组学和 DIA 技术的优势，显著提高了数据的完整性，增加了检测的灵敏度和深度。该技术的应用为解析复杂生物样本提供了强有力的工具，为药物相关生物标志物的发现和分析提供了便利^[6]。本研究在前期巴豆油诱导的大鼠肛门肿胀类痔模型药效研究基础上，进一步采用基于 4D-DIA 的蛋白质组学研究方法，筛选各组别大鼠肛门直肠组织的差异表达蛋白，从蛋白表达层面解析消痔丸对痔病的干预机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 Sprague-Dawley 雄性大鼠，体质量 (190 $\pm$ 10) g，由北京斯贝福生物技术有限公司提供，许可证号 SCXK (京) 2019-0010，实验获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.2022081601]，动物饲养环境 (23 $\pm$ 3) $^{\circ}$ C，12 h 昼夜交替，自由进食饮水。

1.2 主要药品及试剂

消痔丸 (批号 210712，规格 0.04 g/丸，兰州佛慈制药股份有限公司)；巴豆油 (批号 C13225401) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司；p-AMP 活化蛋白激酶 (p-AMPK，批号 21)、AMPK α (批号 11)、p-核因子- κ B (p-NF- κ B p65，批号 17) 购自 Cell Signaling Technology；过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α) 抗体 (批号 1017964-

2) 购自 Abcam; β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (批号 12w2944)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (批号 17y8373) 购自 Affinity; NF- κ B p65 (批号 BD01033306) 购自北京博奥森生物技术有限公司; 引物均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; PowerUp SYBR Green Master Mix (76140100)、Transcriptor First Strand Cdna Synthesis Kit (69252721) 购自瑞士 Roche; 质谱级乙腈及水购自上海安谱实验科技股份有限公司。

1.3 主要试验仪器

EASY-nLC 高效液相色谱仪 (Thermo Fisher Scientific); timsTOF Pro2 串联质谱仪 (Bruker); Fielda-650D 超声波细胞破碎仪 (江苏波场智能科技有限公司); Centrifuge5430R 冷冻离心机 (Eppendorf); Spectra Max plus384 酶标仪 (Softmaxpro Molecular Devices); Tanon-3500R 全自动数码凝胶图像分析系统 (上海天能科技有限公司); MS105DU 分析天平 (梅特勒); PowerPac Basic 电泳仪 (Bio-RAD); LightCycler 480II 荧光定量 PCR 仪 (Roche); BioPhotometer D30 核酸蛋白测定仪 (Eppendorf); BIO-RAD T100PCR 仪 (Bio-Rad Laboratories)。

2 方法

2.1 动物分组及给药

SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为对照组、模型组和消痔丸 (0.81、1.62、3.24 g/kg) 组^[1], 每组 10 只。各给药组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 等体积 0.1% CMC-Na 溶液, 1 次/d, 连续 7 d。第 4 天给药 1 h 后, 除空白组外, 用浸吸 0.16 mL 巴豆油混合液的棉签插入已浅麻醉大鼠肛门保持 13 s, 棉签取出后在肛周均匀涂抹 1 圈, 6 h 后见大鼠肛周组织充血肿胀并有炎性渗出即造模成功^[7]。于末次给药 1 h 后, 麻醉大鼠, 腹主动脉取血后, 取肛门直肠组织于 -80 °C 保存。

根据前期药效结果^[1], 消痔丸 0.81、1.62、3.24 g/kg 3 个剂量组对巴豆油诱导的肛门肿胀模型均有治疗效果, 其中消痔丸 1.62 g/kg 组对急性痔病的改善具有剂量优势。考虑优先选择最佳药效剂量进行机制探索, 以降低组间复杂性与实验误差, 故本实验蛋白质组学研究部分选择消痔丸 1.62 g/kg 组进行分析。

2.2 样品制备

将各组肛门直肠组织样本随机选取 3~4 个混

为 1 个待测样本, 每组获得 3 个混合待测样本进行检测。在每个肛门直肠组织样品加入 1 000 μ L RIPA 工作液充分混匀, 低温研磨 5 min, 冰浴超声 5 min, 充分裂解样品。4 °C 旋转孵育 10 min, 充分溶解蛋白。14 000 $\times g$, 4 °C 离心 15 min, 转移上清至新的 EP 管中进行 BCA 定量。依次进行丙酮沉淀, 蛋白重溶、还原、烷基化, 蛋白酶解, 去除 SDC, 多肽脱盐步骤后, 用于 LC-MS/MS 检测。

2.3 nano LC-MS/MS 检测

每个样品取 1 μ g 多肽经 nano-UPLC 液相系统 EASY-nLC1200 进行分离后联用配备纳升离子源的质谱仪 (Q-Exactive HFX) 进行数据采集。色谱分离采用反相色谱柱 (ReposilPur 120 C18-AQ, 100 μ m $\times$ 15 cm, 1.9 μ m, Dr. Math) 进行。流动相采用乙腈-水-甲酸体系, 其中流动相 A 为 0.1% 甲酸-98% 水溶液 (乙腈为 2%), B 相为 0.1% 甲酸-80% 乙腈溶液 (水为 20%)。色谱柱以 100% 的 A 相平衡后, 样品由自动进样器直接上样到色谱柱, 再经色谱柱梯度分离: 2%~5% B 持续 2 min, 5%~22% B 持续 68 min, 22%~45% B 持续 16 min, 45%~95% B 持续 2 min, 95% B 持续 2 min; 体积流量 300 nL/min, 梯度时长 90 min。

质谱分析使用 Thermo Q-Exactive HFX 完成, Pool 样品采用 6 针 GPF-DIA 采集模式进行, 母离子 (MS1) 扫描分辨率 6×10^4 , 碎片离子 (MS2) 扫描分辨率 30×10^4 。MS1 扫描 AGC 设为 3×10^6 , 最大离子注入时间 30 ms。DIA 扫描标准化碰撞能 (NCE) 设为 27%, 默认价态设为 2⁺。GPF-DIA 扫描使用 m/z 4 交错叠加隔离窗口, 优化后实际窗口为 m/z : 398.4~502.5, 498.5~602.5, 598.5~702.6, 698.6~802.6, 798.6~902.7, 898.7~1 002.7。用于蛋白质组学定量的实际样品采用单针 DIA 模式进行, 隔离窗口为 m/z 24, 扫描范围为 m/z 396.4~1 004.7, 其余参数与 GPF-DIA 方法一致。

2.4 蛋白质鉴定及定量分析

将质谱数据 Raw 文件直接导入到 Proteome Discoverer 2.2 软件进行数据库检索, 谱肽、蛋白定量。定量方法的类型: Reporter Quantification (dia 10plex); 酶切类型: Trypsin; 允许最大的酶漏切位点数目: 2; 前体离子搜库时质量偏差容忍范围: 1×10^{-5} ; 碎片离子搜库时质量偏差容忍范围: 0.02; 设定特定的可变修饰类型: Oxidation/+15.995 (M) and dia 10 plex/+229.163 (K,Y); N 末端的修饰类

型: Acetyl/+42.011 (N-Terminal) and dia 10 plex/+229.163 (N-Terminal); 设定特定的固定修饰类型: Carbamidomethyl/+57.021 (C)。鉴定所用蛋白数据库为 UniProt 数据库。为提高分析结果质量,降低假阳性率,对检索结果做了进一步过滤:可信度在 99% 以上的谱肽 (PSMs) 为可信 PSMs,至少包含 1 个特有肽段的蛋白为可信蛋白,结果只保留可信的 PSM 和蛋白,并做 FDR 验证,去除 FDR>1% 的肽段和蛋白。对结果进行 *t* 检验分析,选取 $P<0.05$,差异倍数 (fold change, FC) ≥ 1.2 或 $FC \leq 0.83$ 的蛋白为差异表达蛋白 (DEPs)。

2.5 生物信息学分析

通过 OmicsBean 数据库对 DEPs 进行生物信息学分析,分别从细胞组分、分子功能和生物过程 3 个方面对靶点蛋白进行基因本体 (GO) 分析,同时对靶点蛋白进行京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 信号通路分析。通过微生物数据库对样本和蛋白质表达维度进行分类,生成分层聚类热图。

2.6 RT-qPCR 实验

称取冻存的肛门组织适量,采用 Trizol 法提取总 RNA,并按试剂盒要求合成 cDNA,用荧光定量 PCR 进行 PCR 扩增, β -actin 作为内参基因, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
β -actin	正向 TGTCACCAACTGGGACGATA
	反向 GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA
p65	正向 TCGAGTCTCCATGCAGCTACGG
	反向 CGGTGGCGATCATCTGTGTCTG
AMPK	正向 ATGATGAGGTGGTGGAGCAGAGG
	反向 GGTTCCTCGGCTGTGCTGGAATC
PGC1 α	正向 GATGGAGACGTGACCACTGACAAC
	反向 GTGCTAAGACCGCTGCATTTCATTG

2.7 Western blotting 实验

取适量大鼠肛门组织加 RIPA 裂解液,充分匀浆,12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,BCA 法对蛋白定量。将蛋白溶液按照 3:1 比例加入 4 $\times$ 蛋白上样缓冲液,100 $^{\circ}\text{C}$ 、变性 5 min,冷却后放入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。取等量蛋白样品以 10% SDS-PAGE 电泳分离,PVDF 转膜,封闭,将所需蛋白条带剪开分别加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。次日,于摇床上用 TBST 洗膜 3~5 次。然后加入快速封闭液

配制的二抗孵育 1 h,再次洗膜。最后用 ECL 发光液于化学发光成像仪中进行曝光,保存条带,进一步用 Image J 进行定量分析。

2.8 统计学分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异性采用 GraphPad Prism 8 统计学软件进行 *t* 检验及单因素方差分析。

3 结果

3.1 差异表达蛋白结果分析

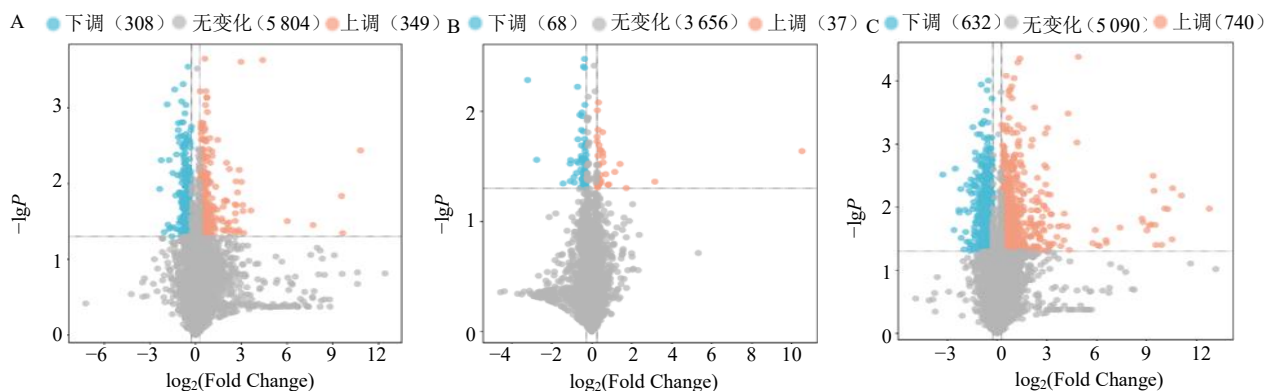
以 $P<0.05$, $FC \geq 1.2$ 或 $FC \leq 0.83$ 为条件筛选模型组 vs 对照组、消痔丸组 vs 模型组、消痔丸组 vs 对照组的 DEPs,火山图见图 1。结果显示,模型组 vs 对照组共有 657 个 DEPs,其中上调 349 个,下调 308 个;消痔丸组 vs 模型组共有 105 个 DEPs,其中上调 37 个,下调 68 个;消痔丸组 vs 对照组共有 1 372 个 DEPs,其中上调 740 个,下调 632 个。

3.2 消痔丸干预的差异蛋白结果分析

为了探究消痔丸发挥治疗痔病的作用机制,将上述模型组与对照组之间的 DEPs 和消痔丸组与模型组之间的 DEPs 取交集进行分析,发现 35 个 DEPs 在经消痔丸干预后存在回调趋势,另有 3 个 DEPs 在消痔丸干预后与模型组比较仍有显著性差异,38 个差异蛋白火山分析图及热图见图 2、3,38 个 DEPs 的详细信息见表 2。鉴于这 38 个 DEPs 在造模前后和药物处理前后都发生了显著的差异表达,推断它们在痔病的发病过程及消痔丸治疗的作用机制中发挥了关键性作用,可能为消痔丸治疗巴豆油诱导的肛门肿胀类痔模型的潜在靶标蛋白。

3.3 生物信息学分析

对 38 个 DEPs 进行 GO 分析,以 *P* 值最小的前 10 个条目进行作图分析,见图 4,这些蛋白在生物学过程方面包括羧酸代谢过程、酮酸代谢过程、有机酸代谢过程、脂质生物合成过程、花生四烯酸代谢过程、异柠檬酸代谢过程、细胞脂质代谢过程等;在细胞组分方面主要包括自噬溶酶体、次级溶酶体、细胞器囊膜、核膜、细胞质、陈旧的肌膜下线粒体等;在分子功能方面主要包括氧化还原酶活性、花生四烯酸 12(S)-脂氧合酶活性、花生四烯酸 15-脂氧合酶活性、异柠檬酸脱氢酶 [NAD(P)+] 活性、氧化还原酶活性等。KEGG 信号通路富集分析结果见图 5,以 $P<0.05$ 为标准,38 个 DEPs 主要富集在以下相关通路:花生四烯酸代谢、三羧酸循环 (TCA 循环)、代谢途径、甘油磷脂代谢、TNF 信



A-模型组 vs 对照组; B-消痔丸组 vs 模型组; C-消痔丸组 vs 对照组。

A-model vs control, B-Xiaozhi Pills vs model, C-Xiaozhi Pills vs control.

图 1 火山图

Fig. 1 Volcanic plot

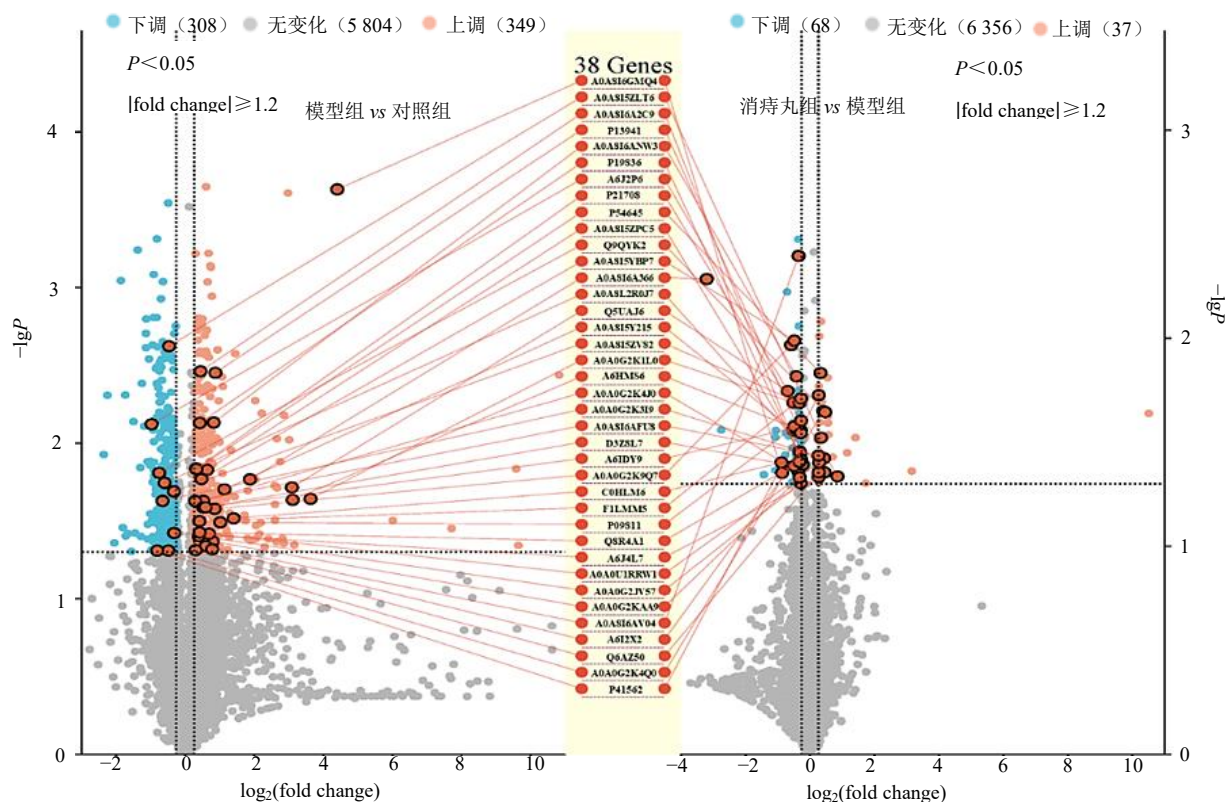


图 2 模型组 vs 对照组与消痔丸组 vs 模型组交集差异蛋白分析图

Fig. 2 Intersection DEPs analysis of model vs control DEPs and Xiaozhi Pills vs model DEPs

号通路、C 型凝集素受体信号通路、铁死亡、逆行内源性大麻素信号传导、坏死性凋亡、VEGF 信号通路、FcεRI 信号通路、IL-17 信号通路、AMPK 信号通路、血小板活化等。推断消痔丸可能通过干预上述生物过程及功能，多方面调节机体机能，进而发挥对痔病的治疗作用。

3.4 验证实验结果

对模型组 vs 对照组，消痔丸组 vs 模型组各组

DEPs 取交集后有显著性差异的蛋白进行生信分析发现，消痔丸可调控与炎症及代谢等过程相关的信号通路，如花生四烯酸代谢、三羧酸循环等，其中 AMPK 信号通路为能量感受器，与糖脂代谢、自噬、炎症等过程密切相关^[8-10]。有文献报道，AMPK 保护细胞免受线粒体功能障碍，抑制内质网和氧化应激，而内质网和氧化应激是 NF-κB 信号传导的有效诱导剂。尽管 AMPK 信号通路在 KEGG 富集分析

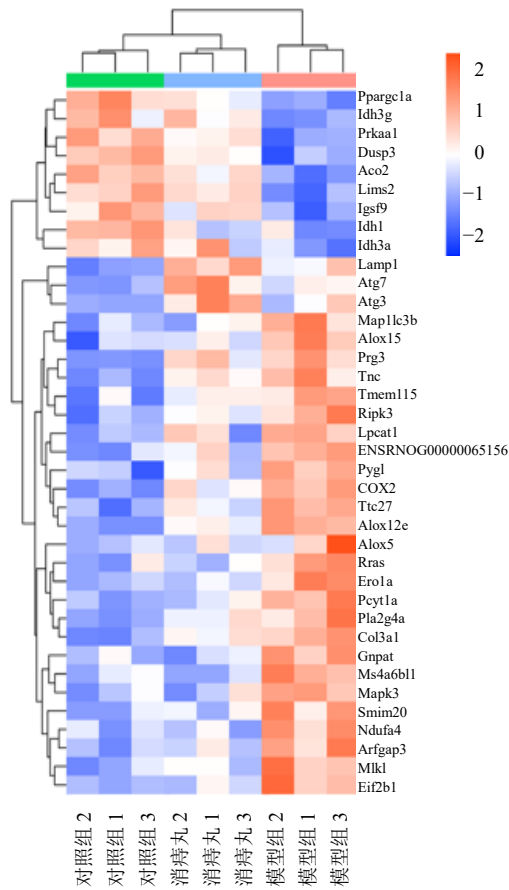


图 3 交集差异蛋白热图分析
Fig. 3 Heat map analysis of intersection DEPs

中的 P 值相对较高 ($P=0.0371$), 且仅富集到 AMPK α 和 PGC-1 α 2 个差异蛋白, 但其生物学意义显著^[11-12]。AMPK 是细胞能量代谢和炎症反应的关键调控节点, 且 AMPK α 和 PGC-1 α 在模型组中均显著下调, 经消痔丸干预后显著回升, 提示该通路在痔病发病及干预中具有重要作用。AMPK 调控的下游通路 (如自噬、脂肪酸代谢、NF- κ B) 在本次蛋白质组学中亦显著富集, 进一步支持 AMPK 通路作为核心验证通路的合理性。因此, 选择 AMPK/PGC-1 α /NF- κ B 信号通路进行蛋白质组学结果验证。

3.4.1 AMPK/PGC-1 α /NF- κ B p65 信号通路关键蛋白 mRNA 表达水平 结果表明, 与模型组比较, 消痔丸各剂量组肛门直肠组织中 PGC-1 α 、AMPK mRNA 表达显著升高, NF- κ B p65 mRNA 表达显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 见图 6。

3.4.2 AMPK/PGC-1 α /NF- κ B p65 信号通路关键蛋白表达情况 与模型组比较, 消痔丸 1.62、3.24 g/kg 组肛门直肠组织中 p-AMPK/AMPK 显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01); 消痔丸各剂量组 PGC-1 α 表达显著升高, p-p65/p65 显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001), 见图 7。

4 讨论

痔是临床上最常见的肛肠疾病之一, 其临床表现为肛门炎症反应, 分泌物增加; 便血; 大便时痔核脱出; 肛门肿胀; 肛门静脉丛血栓; 齿状线上方

表 2 交集差异蛋白信息
Table 2 Information of intersection DEPs

ID 号	基因	模型组 vs 对照组		消痔丸组 vs 模型组	
		FC	P 值	FC	P 值
A0A8I6GMQ4	<i>Alox12e</i>	21.14	0.000 2	0.55	0.044 4
A0A8I5ZLT6	<i>Aco2</i>	0.72	0.002 4	1.27	0.030 0
A0A8I6A2C9	<i>Lpcat1</i>	1.36	0.003 4	0.85	0.040 5
P13941	<i>Col3a1</i>	1.83	0.003 5	0.82	0.028 5
P54645	<i>Prkaa1</i>	0.72	0.006 1	1.25	0.014 7
A0A8I6ANW3	<i>Ttc27</i>	1.77	0.007 4	0.75	0.015 2
P19836	<i>Pcyt1a</i>	1.34	0.007 4	0.82	0.038 2
A6J2P6	<i>Lims2</i>	0.51	0.007 5	1.80	0.046 1
P21708	<i>Mapk3</i>	1.24	0.014 5	0.82	0.024 9
A0A8I5ZPC5	<i>ENSRNOG00000065156</i>	1.55	0.014 8	0.80	0.034 9
Q9QYK2	<i>Ppargc1a</i>	0.59	0.015 5	1.38	0.022 6
A0A8I5YBP7	<i>Gnpat</i>	1.38	0.017 0	0.71	0.010 3
A0A8I6A366	<i>Ms4a6b1l</i>	3.66	0.017 1	0.11	0.005 2
A0A8L2R0J7	<i>Igsf9</i>	0.66	0.018 0	1.37	0.044 1
Q5UAJ6	<i>Ptgs2</i>	8.51	0.019 2	0.62	0.017 9
A0A8I5Y215	<i>Ripk3</i>	2.20	0.019 8	0.70	0.027 8

表 2 (续)

ID 号	基因	模型组 vs 对照组		消痔丸组 vs 模型组	
		FC	P 值	FC	P 值
A0A0G2K1L0	<i>Tnc</i>	12.36	0.022 8	0.70	0.020 4
A6HMS6	<i>Prg3</i>	8.64	0.023 1	0.82	0.027 8
A0A0G2K4J0	<i>Arfgap3</i>	1.44	0.023 4	0.77	0.043 4
A0A0G2K3I9	<i>Dusp3</i>	0.63	0.023 5	1.35	0.037 7
A0A8I6AFU8	<i>Atg7</i>	1.22	0.023 5	1.20	0.036 6
A0A8I5ZV82	<i>Mlkl</i>	1.44	0.024 3	0.80	0.020 4
D3Z8L7	<i>Rras</i>	1.50	0.025 8	0.71	0.041 1
A6IDY9	<i>Ndufa4</i>	1.43	0.025 9	0.70	0.027 0
A0A0G2K9Q7	<i>Map1lc3b</i>	1.81	0.026 4	0.66	0.010 8
C0HLM6	<i>Smim20</i>	2.64	0.030 4	0.54	0.039 5
F1LMM5	<i>Alox5</i>	1.33	0.031 7	0.82	0.019 5
P09811	<i>Pygl</i>	2.02	0.032 2	0.71	0.026 6
Q8R4A1	<i>Ero1a</i>	1.33	0.037 5	0.79	0.039 2
A6J4L7	<i>Idh3a</i>	0.80	0.037 7	1.20	0.046 5
A0A0U1RRW1	<i>Lamp1</i>	1.61	0.038 1	1.22	0.039 5
A0A0G2JV57	<i>Eif2b1</i>	1.31	0.039 5	0.82	0.049 7
A0A0G2KAA9	<i>Pla2g4a</i>	1.73	0.042 8	0.80	0.046 6
A0A8I6AV04	<i>Alox15</i>	1.51	0.045 8	0.78	0.004 0
A6I2X2	<i>Tmem115</i>	1.72	0.048 1	0.81	0.035 5
Q6AZ50	<i>Atg3</i>	1.23	0.048 7	1.20	0.044 1
A0A0G2K4Q0	<i>Idh3g</i>	0.71	0.049 0	1.33	0.022 4
P41562	<i>Idh1</i>	0.57	0.049 0	1.21	0.018 8

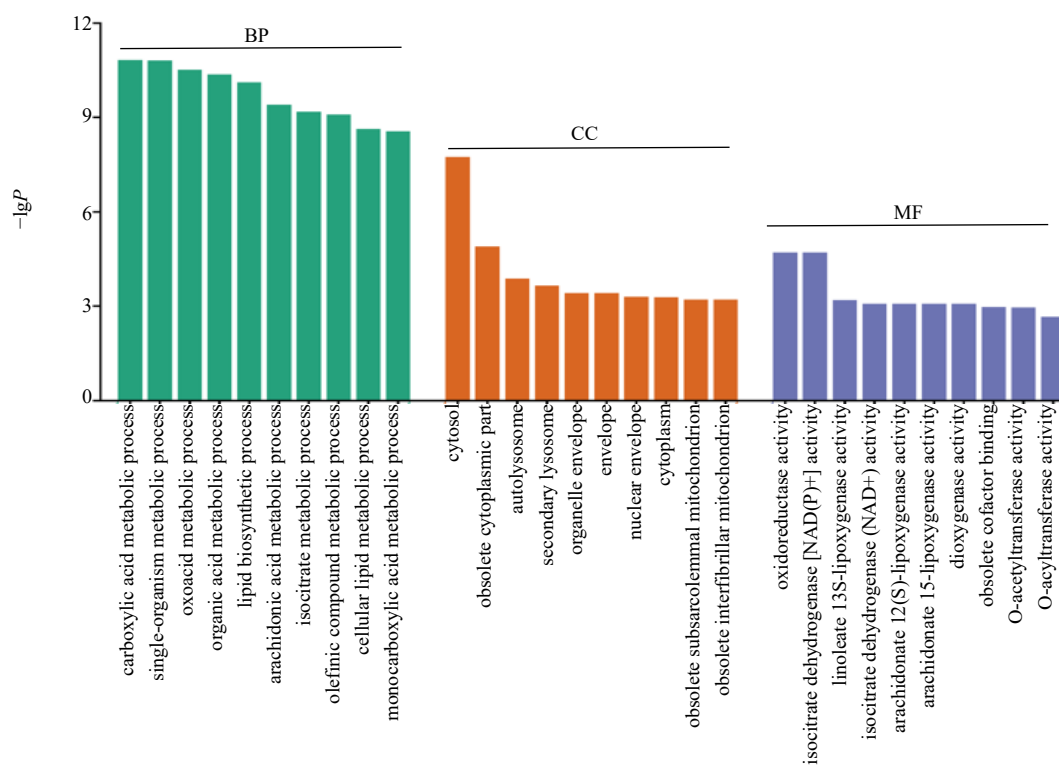


图 4 交集差异蛋白的 GO 分析

Fig. 4 GO analysis of interaction DEPs

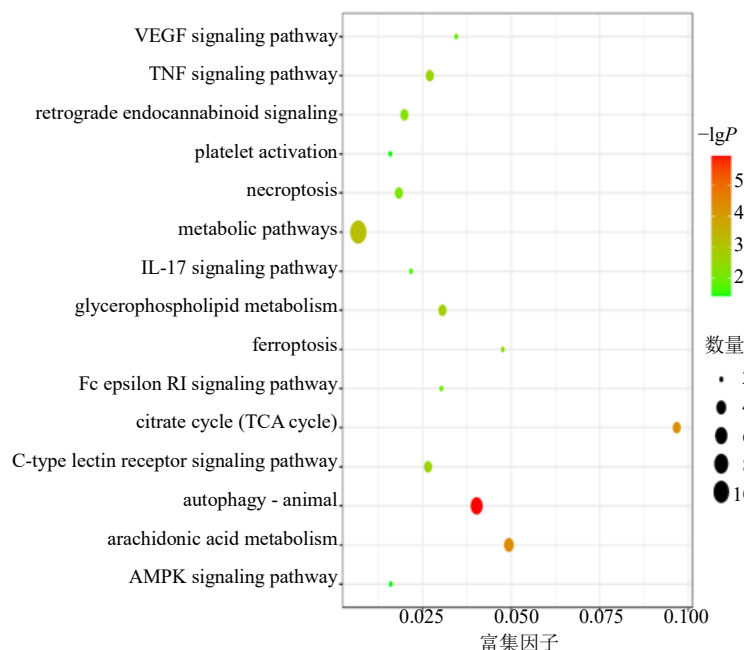
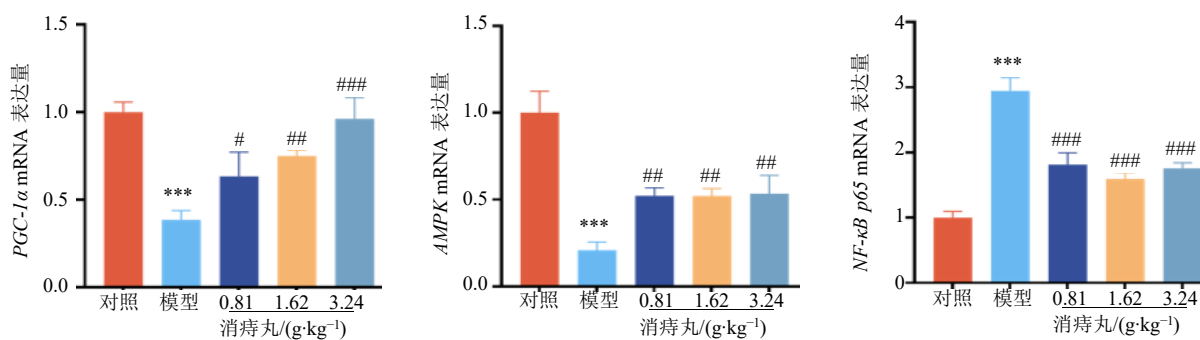


图 5 交集差异蛋白的信号通路富集分析气泡图

Fig. 5 Bubble plot of signaling pathway enrichment analysis of intersection DEPs



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

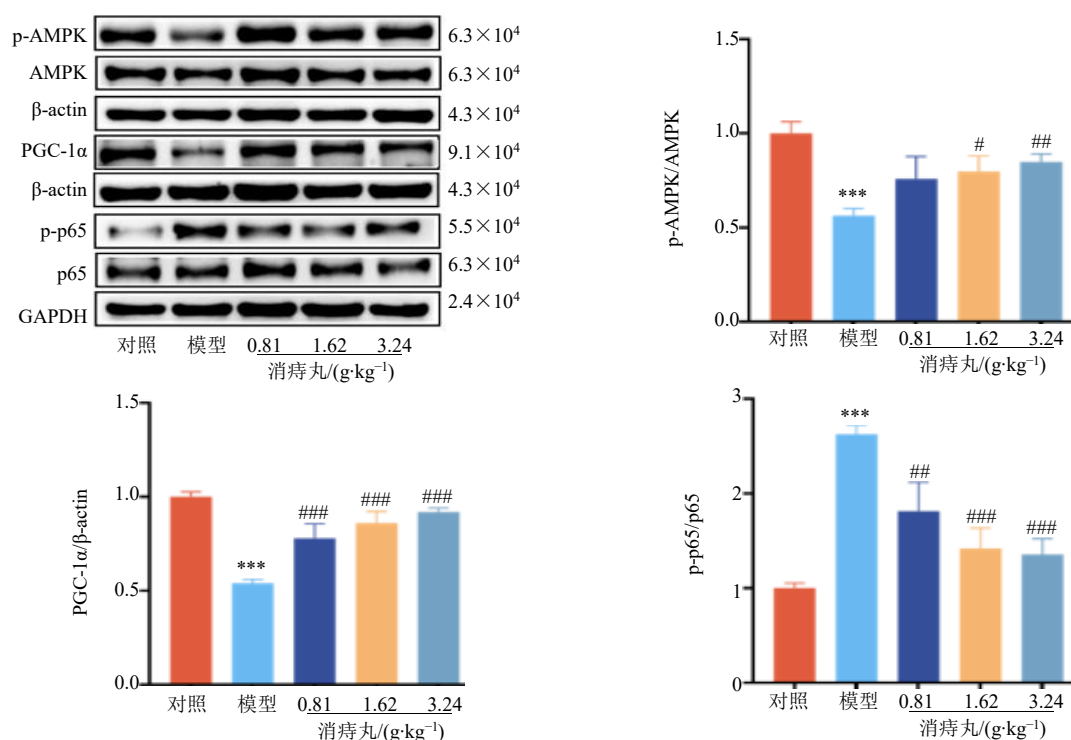
*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 6 AMPK/NF-κB 信号通路关键蛋白 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)Fig. 6 mRNA expression of key proteins in AMPK/NF-κB signaling pathway ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

可见黏膜呈结节状突起；肛缘局部皮肤纤维化、结缔组织增生；肛门皮肤皱，红、肿、热、痛^[7,13]。药物治疗是治疗痔的重要方法，而传统中药在痔病治疗中应用较广泛，《中国痔病诊疗指南（2020）》^[14]中指出常用药材有地榆、地黄、槐角、当归、黄芩等，其可减轻痔的部分症状，对症状性痔的治疗有效。消痔丸系甘肃省名老中医的经验方，在“地榆槐角丸”、“脏连丸”等治痔名方的基础上，结合多年临床医疗经验而提出，本方吸取了“地榆槐角丸”、“脏连丸”清热、凉血、止血、补脏的优点，增加白及加强敛疮生肌、促进伤口愈合的作用；大

黄配合丹皮凉血化瘀，当归、白术、防己与黄芪相使，使益气生血、补中健脾、利水消肿的临床作用更加显著；火麻仁润肠通便，缓解便秘；参照我国传统方法，加入动物大肠，更加强了该药治疗痔疮的效果。

痔病核心病理基础是肛门直肠局部慢性炎症与微循环障碍，巴豆油诱导肛门肿胀模型通过激活 TLR4/NF-κB 通路，释放 TNF-α、IL-6、IL-1β 等促炎因子，导致血管扩张、通透性增加、水肿与疼痛；炎症持续激活可引发黏膜损伤、便血、痔核脱出，形成“炎症-水肿-损伤”恶性循环。本研究通过



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 7 AMPK/NF-κB 信号通路关键蛋白表达

Fig. 7 Expression of key proteins in AMPK/NF-κB signaling pathway

蛋白质组学发现, 消痔通过显著干预 38 个痔病相关蛋白, 调控了与炎症、自噬、代谢、细胞增殖与凋亡等过程相关的信号通路; 分子生物学实验证明, 其能通过调控 AMPK/NF-κB 信号通路及花生四烯酸代谢发挥抗炎等作用。

AMPK 是细胞和整个生物体水平能量代谢稳态的重要调节因子^[15-16]。AMPK 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 在进化过程中高度保守。AMPK 由异三聚体复合物组成, 其中包括催化亚基 α 和两个调节亚基 (β 和 γ)。在哺乳动物组织中存在两个编码 AMPK α -亚基的基因 ($\alpha 1$ 和 $\alpha 2$)、2 个 β -亚基基因 ($\beta 1$ 和 $\beta 2$) 和 3 个 γ -亚基基因 ($\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 和 $\gamma 3$)。AMPK 通过增加 AMP 浓度的变构调节机制激活, 并通过上游激酶丝氨酸/苏氨酸激酶 11 (LKB1)、钙调蛋白依赖性蛋白激酶 β (CaMKK β) 和转化生长因子 β 激活激酶 1 (TGF- $\beta 1$) 磷酸化 α 亚基 (Thr172) 激活。AMPK 具有多种下游底物, 这些通常是参与转录调节的能量代谢酶和蛋白质。AMPK 信号传导的一个主要作用是通过刺激能量产生 (包括葡萄糖和脂质分解代谢) 或通过抑制能量消耗途

径 (例如蛋白质、脂肪酸和胆固醇的合成) 来响应代谢需求。AMPK 一旦激活, 主要调控在哺乳动物的四大类代谢: 蛋白质代谢、脂质代谢、糖类代谢以及自噬和线粒体稳态, 几乎包含生命体的整个生理代谢活动^[17-18]

另有多项研究表明, AMPK 活性降低与炎症 (如脂肪组织和巨噬细胞中的炎症) 之间存在密切联系, AMPK 的激活可抑制不同刺激损伤引起的炎症反应^[19-21]。研究发现, AMPK 的激活可抑制 NF-κB 介导的促炎信号转导, 抑制炎症基因的表达, 减轻炎症损伤^[9]。AMPK 有几个直接磷酸化靶点, 但 AMPK 是通过其下游介质, 如 SIRT1、FoxO 家族和 PGC-1 α 间接抑制 NF-κB 信号, 从而抑制炎症因子的表达^[22]。PGC-1 α 是能量代谢的关键调节因子之一, 例如增强糖酵解和线粒体生物发生^[23-24]。AMPK 磷酸化 PGC-1 α , 触发沉默调节蛋白 1 (SIRT1) 介导的 PGC-1 α 去乙酰化和激活。研究发现 PGC-1 α 表达增加可以抑制人主动脉平滑肌和内皮细胞中 NF-κB 活性和 TNF- α 诱导的促炎反应, 另外证实 PGC-1 α 可在人心脏细胞和小鼠心脏中与 NF-κB 的

p65 亚基结合, NF- κ B 信号的激活增加了 p65 与 PGC-1 α 之间的相互作用,从而降低了 PGC-1 α 蛋白的表达, PGC-1 α 活性降低导致其抗氧化靶基因下调,最终导致氧化应激增加,低 PGC-1 α 水平和伴随的氧化应激进一步促进 NF- κ B 活性,从而加剧炎症反应^[25]。

蛋白质组学结果发现,消痔丸干预后,调控了 38 个差异蛋白的显著变化,对其进行信号通路富集分析发现其可调控 AMPK 信号通路,其中关键蛋白 AMPK α 、PGC-1 α 在模型组发生显著的低表达,而消痔丸干预后二者蛋白表达情况均显著升高,故通过 Western blotting 及 RT-qPCR 实验验证,发现消痔丸可显著增强模型大鼠的 AMPK 及 PGC-1 α 的基因和蛋白表达水平,且增强了 AMPK 的磷酸化水平,升高 p-AMPK/AMPK α 比值;同时,消痔丸显著抑制了模型大鼠 NF- κ B p65 的基因及蛋白表达水平,显著降低 p-p65/p65 比值,抑制 NF- κ B 信号通路的过度激活。同时,消痔丸可显著降低 COX-2 的基因表达,降低 PGE₂ 含量,通过调控花生四烯酸代谢通路降低炎症水平。另外,通过蛋白质组学结果发现,消痔丸显著升高了与自噬相关的蛋白如自噬相关 3 蛋白(ATG3)、ATG7、溶酶体关联膜蛋白 1(LAMP1)等的表达,调控了自噬信号通路;显著升高三羧酸循环通路中异柠檬酸脱氢酶 1(IDH1)、顺乌头酸酶 2(ACO2)、异柠檬酸脱氢酶 3(NAD⁺) α 亚基(IDH3A)的表达,调节能量代谢过程。

值得注意的是,本研究发现消痔丸给药组与对照组之间亦存在大量差异表达蛋白,其数量甚至超过模型组与对照组之间的差异蛋白数。这一现象表明,消痔丸不仅可回调痔病模型的异常蛋白表达,也对正常大鼠的蛋白表达谱产生广泛影响。考虑到消痔丸为 12 味药材组成的中药复方,具有清热、凉血、补气、润肠等多靶点作用,其可能在一定程度上调节机体的正常生理功能,如能量代谢、免疫稳态等。并且实验期间各组大鼠精神、饮食、体重无显著差异,未观察到明显的不良反应或脏器损伤,提示其对正常机体的调控作用可能属于药物正常的药理作用范围,而非毒性反应。

综上,通过巴豆油诱导的大鼠肛门肿胀模型药效实验、蛋白质组学研究及基于分子生物学的靶蛋白验证等研究发现,消痔丸可通过调节 AMPK α 、PGC-1 α 、NF- κ B p65 的基因及蛋白表达水平以及 AMPK 和 NF- κ B p65 的磷酸化水平,调控 AMPK/

PGC-1 α /NF- κ B p65 信号通路;同时通过调节 COX-2 的基因及蛋白表达水平,调控花生四烯酸代谢通路,进而共同达到降低致炎致痛细胞因子水平,发挥抗炎及调控能量代谢过程的生物活性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 孙科,李新,韩彦琪,等.消痔丸对巴豆油致肛门肿胀模型大鼠的药效及作用机制研究[J].中草药,2023,54(20):6734-6742.
- [2] 李新,华永晨,王春芳,等.消痔丸对醋酸致肛门溃疡模型大鼠的作用机制研究[J].现代药物与临床,2023,38(10):2410-2417.
- [3] 宋紫腾,王莲萍,姚鹏飞,等.消痔丸对复方地芬诺酯致小鼠便秘模型的药效评价及作用机制[J].药物评价研究,2023,46(11):2330-2337.
- [4] 孔祥文,于新,柴军红,等.定量蛋白质组学技术在中药作用机制研究中的应用[J].中药材,2022,45(11):2775-2782.
- [5] Guo T N, Aebersold R. Recent advances of data-independent acquisition mass spectrometry-based proteomics[J]. *Proteomics*, 2023, 23(7-8): e2200011.
- [6] Meier F, Brunner A D, Frank M, et al. diaPASEF: Parallel accumulation-serial fragmentation combined with data-independent acquisition[J]. *Nat Methods*, 2020, 17(12): 1229-1236.
- [7] 谢逸轩,王赛,朱飞鹏,等.基于中西医临床病症特点的痔疮动物模型分析[J].中药新药与临床药理,2022,33(7):939-943.
- [8] Saikia R, Joseph J. AMPK: A key regulator of energy stress and calcium-induced autophagy[J]. *J Mol Med*, 2021, 99(11): 1539-1551.
- [9] Xu Y H, Bai L, Yang X W, et al. Recent advances in anti-inflammation via AMPK activation[J]. *Heliyon*, 2024, 10(13): e33670.
- [10] Wang S, Li H, Yuan M, et al. Role of AMPK in autophagy[J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 1015500.
- [11] Salminen A, Hyttinen J M, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: Impact on healthspan and lifespan[J]. *J Mol Med*, 2011, 89(7): 667-676.
- [12] Kauppinen A, Suuronen T, Ojala J, et al. Antagonistic crosstalk between NF- κ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(10): 1939-1948.
- [13] 王东,周如乐,王慧,等.肛泰栓联合复方荆芥熏洗剂治疗混合痔外剥内扎术后的临床研究[J].中草药,

- 2025, 56(5): 1682-1686.
- [14] 中国中西医结合学会大肠肛门病专业委员会. 中国痔病诊疗指南 (2020) [J]. 结直肠肛门外科, 2020, 26(5):519-533.
- [15] Canto C, Auwerx J. AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(20): 3407-3423.
- [16] Steinberg G R, Kemp B E. AMPK in health and disease [J]. *Physiol Rev*, 2009, 89(3): 1025-1078.
- [17] Herzig S, Shaw R J. AMPK: Guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(2): 121-135.
- [18] Steinberg G R, Hardie D G. New insights into activation and function of the AMPK [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(4): 255-272.
- [19] Cordero M D, Williams M R, Ryffel B. AMP-activated protein kinase regulation of the NLRP3 inflammasome during aging [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2018, 29(1): 8-17.
- [20] Tong X S, Ganta R R, Liu Z P. AMP-activated protein kinase (AMPK) regulates autophagy, inflammation and immunity and contributes to osteoclast differentiation and functionabs [J]. *Biol Cell*, 2020, 112(9): 251-264.
- [21] Shrungeswara A H, Unnikrishnan M K. Energy provisioning and inflammasome activation: The pivotal role of AMPK in sterile inflammation and associated metabolic disorders [J]. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*, 2021, 20(2): 107-117.
- [22] Salminen A, Hyttinen J M, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: Impact on healthspan and lifespan [J]. *J Mol Med*, 2011, 89(7): 667-676.
- [23] 王慧婷, 张岩晨, 徐梦怡, 等. 能量代谢关键调控因子 PGC-1 α 的研究进展 [J]. 生理学报, 2020, 72(6): 804-816.
- [24] Abu Shelbayeh O, Arroum T, Morris S, *et al.* PGC-1 α is a master regulator of mitochondrial lifecycle and ROS stress response [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(5): 1075.
- [25] Kim H J, Park K G, Yoo E K, *et al.* Effects of PGC-1 α on TNF- α -induced MCP-1 and VCAM-1 expression and NF- κ B activation in human aortic smooth muscle and endothelial cells [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(3): 301-307.

[责任编辑 高源]