

基于网络药理学、分子对接技术及实验验证研究消痔丸治疗痔病药效物质基础

华永晨¹, 宋紫腾^{2,3#}, 王莲萍¹, 张嘉慧⁴, 许 浚^{2,3*}, 张铁军^{2,3*}

1. 兰州佛慈制药股份有限公司, 甘肃 兰州 730000

2. 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

3. 和光中药科技(天津)有限公司, 天津 300462

4. 天津中医药大学, 天津 301617

摘要: **目的** 基于网络药理学及分子对接技术探究消痔丸治疗痔病的作用机制, 并结合体外实验初步明确其药效物质基础。**方法** 选取消痔丸中主要活性成分, 利用 Swiss Target prediction、TCMSP 预测成分靶点; 通过 GeneCards 等数据库获取痔病相关靶点; 借助 STRING 12.0 构建交集靶点的蛋白质相互作用(PPI)网络并筛选核心靶点; 利用 Metascape 进行交集靶点的生物信息学分析, 通过 Cytoscape 3.9.1 软件构建网络图; 采用 Schrödinger2020 Maestro12.4 进行分子对接; MTS 法检测细胞存活率; Griess 法检测一氧化氮(NO)含量; Transwell 小室法检测细胞血管通透性; 细胞划痕实验检测细胞迁移率; ELISA 法检测因子和蛋白含量; 采用钙离子荧光法测定对五羟色胺受体 2A(HTR2A)、瞬时受体电位 A1(TRPA1)、瞬时受体电位香草醛亚家族 1(TRPV1)的拮抗作用; 采用凝血因子分析仪测定凝血四项, 比浊法测定血小板聚集率。**结果** 筛选出毛蕊异黄酮葡萄糖苷、山柰酚、丹皮酚、白术内酯 II 等 34 个主要活性成分, 获得 81 个成分-疾病交集靶点, 确定 15 个核心靶点, 涉及 158 条信号通路。分子对接显示核心成分与靶点有较好的结合作用。体外实验表明, 24 个化合物显著抑制 RAW264.7 释放 NO、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β); 8 个化合物降低 HUVEC 细胞通透性, 上调血管内皮钙黏蛋白(VE-Cadherin)、闭合蛋白-5(Claudin5)、紧密连接蛋白 1(ZO-1)表达; 15 个化合物促进人真皮成纤维细胞(HDF)的增殖与迁移, 提高表皮细胞生长因子(EGF)、转化生长因子 β 1(TGF- β 1)、血管内皮生长因子(VEGF)水平; 8、11、6 个化合物分别拮抗 HTR2A、TRPA1 及 TRPV1 受体; 5 个化合物显著延长凝血酶时间(TT)、活化部分凝血酶原时间(APTT)、凝血酶原时间(PT), 6 个化合物增加纤维蛋白原(FIB)含量, 7 个化合物可促进血小板聚集($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。**结论** 消痔丸通过抗炎消肿、促进创面愈合、止痛、止血等多重途径发挥治疗痔病的作用。

关键词: 消痔丸; 网络药理学; 分子对接; 体外实验; 药效物质基础; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 山柰酚; 丹皮酚

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2026)07-1883-17

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.07.005

Material basis of Xiaozhi Pills in treatment of hemorrhoids based on network pharmacology prediction, molecular docking, and experimental verification

HUA Yongchen¹, SONG Ziteng^{2,3}, WANG Lianping¹, ZHANG Jiahui⁴, XU Jun^{2,3}, ZHANG Tiejun^{2,3}

1. Lanzhou Foci Pharmaceutical Co., Ltd., Lanzhou 730000, China

2. National 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

3. Huguang TCM Technology (Tianjin) Co., Ltd, Tianjin 300462, China

4. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

收稿日期: 2026-04-30

作者简介: 华永晨, 高级工程师, 从事中药学相关研究。E-mail: hyc901128@163.com

#共同第一作者: 宋紫腾, 助理研究员, 从事中药作用机制研究。E-mail: songziteng@tipr.com.cn

*通信作者: 张铁军, 研究员, 从事中药资源、中药质量和新产品开发。E-mail: zhangtj@cmhk.com

许 浚, 研究员, 从事中药质量和中药大品种二次开发。E-mail: xujuntj@163.com

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Xiaozhi Pills in treatment of hemorrhoids based on network pharmacology and molecular docking, and to preliminarily identify its material basis through *in vitro* experiments. **Methods** The main active components of Xiaozhi Pills were selected, and the targets were predicted using Swiss Target Prediction and TCMSP. Hemorrhoid-related targets were obtained from databases such as GeneCards. PPI network of the intersecting targets was constructed using STRING 12.0, and core targets were screened. Bioinformatics analysis of the intersecting targets was performed using Metascape, and the network diagram was constructed using Cytoscape 3.9.1. Molecular docking was carried out using Schrödinger 2020 Maestro 12.4. Cell viability was assessed using the MTS assay, NO content was measured by Griess assay, vascular permeability was assessed using the Transwell assay, and cell migration rate was evaluated using the scratch wound healing assay. The levels of cytokines and proteins were measured by ELISA. Antagonistic effects on HTR2A, TRPA1, and TRPV1 were determined by calcium ion fluorescence assay. Four coagulation parameters were measured using a coagulation analyzer, and platelet aggregation rate was determined by turbidimetric method. **Results** 34 main active components such as genistein glucoside, kaempferol, paeonol, atractylenolide II were screened, yielding 81 component-disease intersecting targets, and 15 core targets were identified, involving 158 signaling pathways. Molecular docking showed good binding affinity between core components and targets. *In vitro* experiments showed that 24 compounds significantly inhibited the release of NO, TNF- α , and IL-1 β from RAW264.7 cells. 8 Compounds reduced HUVEC cell permeability and upregulated the expression of VE-cadherin, Claudin-5, and ZO-1. 15 Compounds promoted the proliferation and migration of HDF and increased the levels of EGF, TGF- β 1, and VEGF. 8, 11, and 6 compounds antagonized HTR2A, TRPA1, and TRPV1 receptors, respectively. 5 Compounds significantly prolonged TT, APTT, and PT. 6 Compounds increased FIB content, and 7 compounds promoted platelet aggregation ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** Xiaozhi Pills exert therapeutic effects on hemorrhoids through multiple pathways including anti-inflammation, swelling reduction, wound healing promotion, pain relief, and hemostasis.

Key words: Xiaozhi Pills; network pharmacology; molecular docking; *in vitro* experiments; mechanism; genistein glucoside; kaempferol; paeonol

痔病俗称痔疮，是一种常见的肛肠疾病，在我国发病率很高，没有特定的发病年龄，但发病率会随着年龄升高而增加，目前痔疮的主要病因尚不明确，但便秘、长期大量饮酒、进食刺激性食物和久坐久立是诱发痔疮的重要因素^[1]。根据痔的发病部位可分为内痔、外痔和混合痔，其中混合痔在临床中最常见，以便后出血、肛门疼痛坠胀、肛门瘙痒、肛门肿物脱出、肛周潮湿、便秘等为主要临床表现，对患者的正常生活影响较大^[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、止痛功效，主治痔疾肿痛，便秘出血，脱肛不收以及肠风下血，积滞不化等症。消痔丸临床治疗痔疮的效果较好，且未见明显不良反应，但其发挥药效的作用机制及物质基础尚不清楚。本研究旨在通过网络药理学、分子对接、体外实验验证确定消痔丸治疗痔病的作用机制及药效物质基础。

1 网络药理学与分子对接研究

1.1 目标化合物的选取及化合物疾病靶点筛选

化合物选取原则：（1）基于本课题组使用

UPLC-Q/TOF-MS 对消痔丸进行化合物表征后的主要成分。（2）根据“君臣佐使”配伍规律，兼顾化合物结构类型及药效活性选取各类型化合物。（3）结合单味药中入血成分进行筛选；利用 SwissTarget Prediction 数据库筛选化合物靶点。以“hemorrhoid、piles”为关键词，使用 GeneCards、DrugBank、TTD、Disgene 数据库进行检索，得到痔疮相关靶点；利用 Venny 2.1.0 绘制活性成分与痔疮靶点的韦恩图，确定交集靶点。

1.2 蛋白质相互作用网络（PPI）的构建及生物信息学分析

利用 STRING 12.0 数据库 (<http://string-db.org/>) 构建交集靶点的 PPI 网络；将数据导入 Cytoscape 3.9.1 软件，对 PPI 进行可视化处理，经拓扑学分析，筛选出核心靶点；采用 Metascape 在线分析平台对交集靶点进行基因本体（GO）功能分析和京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析，依据 P 值排序，取排名靠前的条目绘制柱状图和气泡图。

1.3 “复方-药材-成分-靶点-通路-药理作用”网络的构建

利用 Cytoscape 3.9.1 构建消痔丸“复方-药材-成分-靶点-通路-药理作用”网络图，并使用“Network Analyzer”对网络进行分析。

1.4 分子对接验证

在 Protein Data Bank 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 中下载核心靶点的受体结晶复合物; 将受体依次导入 Schrödinger2020 Maestro12.4 软件与配体进行对接, 将结果进行可视化处理。

2 体外实验研究

2.1 材料

2.1.1 试剂 消痔丸(水蜜丸), (批号 210712, 兰州佛慈制药有限公司)。粉防己碱、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、芍药苷、没食子酸、芦丁(批号分别为 0711-200005、110756-200110、110795-200806、110796-200716、110758-200912、110736-202044、0831-9501、100080-200707, 质量分数分别为 $\geq 98\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 90.5%) 购自中国药品生物制品检定研究院。丹皮酚、小檗碱、槐角苷、白术内酯II、阿魏酸、Z-藁本内酯、异紫堇定碱、木兰花碱、染料木素、地榆皂苷 I (批号分别为 L15D9D77791、S01A10K94340、Z29D6L8101、M22A10S95762、L03A9D57744、R06S10F97106、J26HB175042、A18IB223349、J27IA218686、D30GB173020, 质量分数分别为 98% 、 98% 、 98% 、 99.97% 、 98% 、 99.16% 、 $\geq 98\%$ 、 98% 、 98% 、 $\geq 98\%$) 购自上海源叶生物科技有限公司。黄芪甲苷、鞣花酸、山柰酚、防己诺林碱、大黄酸、芒柄花素(批号分别为 MUST-18091311、MUST-18052603、MUST-18091810、MUST-16040317、MUST-14111905、MUST-14091205, 质量分数分别为 $\geq 98\%$ 、 99.65% 、 99.30% 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 99.03%) 购自成都曼思特生物科技有限公司。毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号 10060223, 质量分数 97.60%) 购自天津一方科技有限公司。白及苷(批号 JOT-11848, 质量分数 99.59%) 购自成都格力普生物技术有限公司。手参苷III(批号 11M-AYX-24-3, 质量分数 98.10%) 购自 PANPHY 化学品公司。地塞米松、5-CT、甲磺酸甲硫替平、二磷酸腺苷(ADP)(批号分别为 WXBD5583V、102M4701V、109K4612、SLCB5611) 购自美国 Sigma 公司。脂多糖(LPS, 批号 3231030008) 购自北京索莱宝。

细胞增殖检测试剂盒(MTS, 批号 0000491080, Promega), 一氧化氮(NO)检测试剂盒(批号 052223231027, 上海碧云天), FITC-Dextran (MW40000) (批号 HY-128868D, 美国 Med

Chemexpress 生物科技公司), 小鼠白细胞介素(IL)- 1β 试剂盒、小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 试剂盒、表皮细胞生长因子(EGF) 试剂盒、VEGF 试剂盒、转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 试剂盒(批号分别为 2311101、2310261、2404262、2404181、2404221, 上海西唐生物), 血管内皮钙粘蛋白(VE-Cadherin) 试剂盒、闭锁连接蛋白-1(ZO-1) 试剂盒、紧密连接蛋白 5 (Claudin 5) 试剂盒(批号分别为 WZ060VJT6052、WZ04LX6F3549、WZ05H6644957, Elabscience), HC-030031、PF-04745637、Ruthenium Red(批号 HY-15064、HY-120689、HY-103311, 美国 MedChemexpress 生物科技公司), Fluo-4 Direct 试剂盒(批号 2738306, Invitrogen-F10471), Ca5 染料(批号 3348444, Molecular Devices), Probenicid (批号 2506000, Invitrogen), 凝血酶时间(TT)、活化部分凝血酶原时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、纤维蛋白原(FIB) 试剂盒(批号分别为 121359、1122782、105545、132240, 上海太阳生物技术有限公司)。

2.1.2 仪器 BDS200 倒置显微镜、311 MCO-5M CO₂ 细胞培养箱购自赛默飞世尔科技公司; Spectra Max M5 酶标仪、FLIPR Tetra System 购自 Molecular Devices 公司; SC40 (LG-PABER-I) 半自动凝血因子分析仪购自北京中勤世帝科学仪器有限公司; AG400 半自动血小板聚集仪购自北京泰利康信科技术有限公司。

2.1.3 细胞 单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7) 购自武汉普诺赛生命有限公司用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基进行培养; 人脐静脉内皮细胞株(HUVEC) 购自上海雅吉生物科技有限公司, 用 ECM 培养基进行培养; 人真皮成纤维细胞株(HDF) 购自上海中乔新舟生物技术有限公司, 用人真皮成纤维细胞专用培养基采用常规方法进行培养; 稳定表达 HTR2A 受体的 HEK293 细胞(DMEM+ 10% D-FBS+ $300\text{ }\mu\text{g/mL}$ G418 培养)、稳定表达的 TRPA1 受体的 HEK293 细胞(DMEM+ 10% FBS+ 1% Pen/Strep 培养)、稳定表达 TRPV1 受体的 CHO 细胞(Ham's F12+ 10% FBS+ 1% Pen/Strep 培养)均来源于上海药明康德新药开发有限公司。

2.1.4 动物 日本大耳白兔, 普通级, 日龄 120~150 d, 体质量 $2.5\sim 3.0\text{ kg}$, 购自天津裕达实验动物养殖有限公司, 生产许可证号 SCXK(津)2021-0001。

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.2024040803]。

2.2 方法

2.2.1 抗炎消肿药效物质验证

(1) 细胞上清液 NO、TNF- α 、IL-1 β 含量检测: 取 RAW 264.7 细胞, 接种于 96 孔板, 设空白组, 模型组, 地塞米松 (100 $\mu\text{mol/L}$) 组, 消痔丸 (8、40、200 $\mu\text{g/mL}$) 组, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、山柰酚、丹皮酚、大黄素甲醚、白术内酯 II、阿魏酸、芦丁、槐角苷、芍药苷、没食子酸、芦荟大黄素、异紫堇定碱、木兰花碱 (4、20、100 $\mu\text{mol/L}$) 组, 粉防己碱、Z-藁本内酯、防己诺林碱、小檗碱、大黄酸 (0.4、2、10 $\mu\text{mol/L}$) 组, 大黄素、黄芪甲苷 (2、10、50 $\mu\text{mol/L}$) 组, 鞣花酸、染料木素 (0.08、0.4、2 $\mu\text{mol/L}$) 组, 大黄酚 (0.004、0.02、0.1 $\mu\text{mol/L}$) 组, 地榆皂苷 I (0.04、0.2、1 $\mu\text{mol/L}$) 组, 空白组加入含 10% 血清的 DMEM 培养基, 模型组加入 0.1 $\mu\text{g/mL}$ LPS, 各给药组加入相应浓度药物和 0.1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 混合溶液, 培养 24 h。收集细胞上清液, 按试剂盒说明书检测 NO、TNF- α 、IL-1 β 含量。

(2) 血管内皮细胞通透性检测: 取 HUVEC 细胞铺在 24 孔 Transwell (0.4 μm) 板的上层小室中。待长成单层细胞后, 更换为无血清 ECM 培养基饥饿培养细胞 2 h, 分组给药。设空白组, 模型组, 地塞米松组 (10 $\mu\text{mol/L}$), 消痔丸 (40、200、1 000 $\mu\text{g/mL}$) 组, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、白术内酯 II、芦丁、槐角苷、芍药苷、异紫堇定碱、木兰花碱 (4、20、100 $\mu\text{mol/L}$) 组, 大黄素甲醚 (2、10、50 $\mu\text{mol/L}$) 组, 染料木素 (0.4、2、10 $\mu\text{mol/L}$) 组, 空白组加入无血清 ECM 培养基, 模型组加入含 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 的无血清培养基, 各给药组加入相应浓度药物和 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 混合溶液, 培养 24 h 后 PBS 冲洗上下层小室 2 次, 下层小室加入 600 μL PBS, 上层小室加入 100 μL 含有 FD40 (0.1 mg/mL) 的 PBS, 孵育 1 h。收集下层小室溶液, 于激发波长 495 nm, 发射波长 525 nm 下测定荧光值, 计算 FD40 含量。

(3) Claudin5、ZO-1、VE-Cadherin 含量检测: 取 HUVEC 细胞, 接种于 6 孔板, 设空白组, 模型组, 地塞米松 (10 $\mu\text{mol/L}$)、消痔丸 (40、200、1 000 $\mu\text{g/mL}$) 组, 不同浓度化合物给药组[给药浓度同 2.2.1 (2)], 空白组加入 ECM 培养基, 模型组加入 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS, 各给药组加入相应浓度药物和 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 混合溶液, 培养 24 h。收集细胞上清

液, 按照试剂盒说明书检测各组 VE-Cadherin、ZO-1、Claudin5 表达水平。

2.2.2 生肌药效物质验证

(1) 细胞增殖率的检测: 取 HDF 细胞, 接种于 96 孔板, 设空白组, 消痔丸给药组 (1、10、100 $\mu\text{g/mL}$), 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、丹皮酚、芦丁、槐角苷、芍药苷、黄芪甲苷、木兰花碱、地榆皂苷 I、白及苷、芒柄花素、手参苷 III (1、10、100 $\mu\text{mol/L}$), 山柰酚、大黄素甲醚、没食子酸、白术内酯 II、芦荟大黄素、染料木素 (浓度分别为 0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$), 空白组加入无血清培养基, 各给药组加入含相应浓度药物的培养基, 培养 24 h。避光加入 MTS 孵育 2 h, 采用酶标仪检测 490 nm 处吸光度 (A) 值, 计算细胞增殖率。

$$\text{细胞增殖率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

(2) 细胞划痕实验: 取 HDF 细胞接种于 12 孔板, 培养过夜, 用 200 μL 枪头垂直于孔板底部划痕, 弃去培养基, PBS 冲洗 1 次。设空白组, 消痔丸给药 (1、10、100 $\mu\text{g/mL}$) 组, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、丹皮酚、芦丁、槐角苷、芍药苷、黄芪甲苷、木兰花碱、地榆皂苷 I、白及苷、芒柄花素、手参苷 III (1、10、100 $\mu\text{mol/L}$), 山柰酚、大黄素甲醚、没食子酸、白术内酯 II、芦荟大黄素、染料木素 (浓度分别为 0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$), 空白组加入无血清培养基, 各给药组加入含相应浓度药物的无血清培养基。分别在划痕并给药后的 0、24 h 于显微镜下观察并拍照, 用 Image J 软件计算细胞迁移率。

(3) EGF、TGF- β 1、VEGF 含量检测: 取 HDF 细胞接种于 12 孔板, 培养 24 h 后按照 2.2.2 (2) 项下分组及给药, 孵育 24 h 后收集细胞上清液。按相关试剂盒说明书分别检测上清液中 EGF、TGF- β 1、VEGF 含量。

2.2.3 止痛药效物质验证

(1) 对 HTR2A 受体的拮抗作用: 将稳定表达 HTR2A 受体的 HEK293 细胞接种于 384 孔板, 孵育过夜。产生 80% 最大效应浓度 (EC_{80}) 检测: 激动剂 5-CT 梯度稀释 (起始终浓度 1 000 nmol/L) 至化合物板, 每孔加缓冲液后离心。细胞板弃培养基, 每孔加 20 μL 缓冲液和 20 μL 2 $\times$ Fluo-4 DirectTM 缓冲液, 孵育 50 min 后室温放置 10 min。将细胞板、化合物板及枪头置入 FLIPR, 转移 10 μL 激动剂至细胞板, 读数计算 EC_{80} 。化合物检测: 将参考化合物甲磺酸甲硫替平梯度稀释 (起始终浓度 2 000

nmol/L), 分别转移 1 800 nL 参考化合物(阳性对照)、DMSO(阴性对照)、受试药物至 384 孔化合物板, 消痔丸终浓度 100、1 000 $\mu\text{g/mL}$, 异紫堇定碱、木兰花碱、粉防己碱、防己诺林碱、阿魏酸、藁本内酯、芦丁、丹皮酚、芍药苷、没食子酸、小檗碱、大黄素甲醚、大黄素、山柰酚、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、黄芪甲苷、槐角苷、芒柄花素、染料木素、白术内酯 II 终浓度 10、100 $\mu\text{mol/L}$ 。每孔加缓冲液后离心。细胞板弃培养基, 每孔加 20 μL 缓冲液和 20 μL 2 $\times$ Fluo-4 DirectTM 缓冲液, 孵育 50 min 后室温放置 10 min。配制 6 $\times$ EC₈₀ 激动剂, 每孔 30 μL 加入 384 孔化合物板, 离心。将化合物板、EC₈₀ 板、细胞板及枪头放入 FLIPR, 运行软件, 添加 10 μL 受试/参考化合物到细胞板中, 读取荧光; 再添加 10 μL 6 $\times$ EC₈₀ 激动剂到细胞板中, 读取荧光。

$$\text{抑制率} = 100 - (\text{RLU-LC}) / (\text{DMSO-LC})$$

RLU: 相对光吸收值, 1 至 maximum allowed 的读值;
DMSO: DMSO 组荧光信号平均值; LC: 拮抗剂最高浓度点荧光信号平均值

(2) 对 TRPV1 和 TRPA1 的拮抗作用: 将 hTRPA1 和 hTRPV1 稳转细胞接种于 PDL 包被的 96 孔板孵育过夜, 阳性对照分别为 HC030031 和钆红, 阴性对照均为 DMSO 溶剂。化合物板中设置阳性对照、阴性对照及受试药物消痔丸、异紫堇定碱、木兰花碱、粉防己碱、防己诺林碱、阿魏酸、藁本内酯、芦丁、丹皮酚、芍药苷、没食子酸、小檗碱、大黄素甲醚、大黄素、山柰酚、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、黄芪甲苷、槐角苷、芒柄花素、染料木素、白术内酯 II, 浓度同 2.2.3 (1) 项下; 激动板中采用钙离子作为通道激动剂; FLIPR 检测: 细胞板弃培养基, 每孔加 50 μL Ca²⁺ 染料孵育 1 h。将细胞板、化合物板、激动剂板及枪头放入 FLIPRTETRA 中, 运行程序。读取基线 60 s 后, 依次从化合物板吸取 25 μL 、从激动剂板吸取 25 μL 加入细胞板, 持续记录至少 5 min (采样率 1 Hz)。数据以加入激动剂后 $\Delta F/F$ 的最大值导出, 其中 F 为基线 RFU, ΔF 为加入激动剂后 RFU 与基线差值。Avg100% 为最高浓度激动剂处理的 $\Delta F/F$ 平均值, Avg0% 为激动剂溶剂处理的 $\Delta F/F$ 平均值, Scomp. 表示样品孔的 $\Delta F/F$ 。

$$\text{抑制率} \% = (\text{Scomp.} - \text{Avg0\%}) / (\text{Avg100\%} - \text{Avg0\%})$$

2.2.4 止血药效物质验证

(1) 兔血浆的收集: 日本大耳白兔适应性喂养一段时间后, 禁食过夜, 颈总动脉取血, 3.8% 枸橼

酸钠抗凝, 1 000 r/min 离心 10 min 制备富含血小板血浆; 3 000 r/min 离心 10 min 制备贫血小板血浆, 收集备用。

(2) 实验分组及给药: 实验分为空白组、DMSO 溶剂对照组、受试药物组, 凝血四项消痔丸浓度为 0.5、5、50、100、500、1 000 $\mu\text{g/mL}$, 山柰酚、粉防己碱、鞣花酸、小檗碱、Z-藁本内酯、芍药苷、木兰花碱、染料木素、地榆皂苷 I、白及苷浓度设为 0.5、5、50、100、500、1 000 $\mu\text{mol/L}$, DMSO 体积分数为 0.005%、0.05%、0.5%、1%、5%、10%; 血小板聚集率检测消痔丸浓度为 0.05、0.5、5、50、100 $\mu\text{g/mL}$, 化合物浓度为 0.05、0.5、5、50、100 $\mu\text{mol/L}$, DMSO 体积分数为 0.000 5%、0.005%、0.05%、0.5%、1%。

(3) 凝血四项及血小板聚集率检测 分别按照凝血酶时间(TT)测定试剂盒、活化部分凝血活酶时间(APTT)测定试剂盒、凝血酶原时间(PT)测定试剂盒、纤维蛋白原(FIB)测定试剂盒说明书进行操作。按照半自动血小板聚集仪使用说明操作。

2.3 统计学分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计软件为 Graphpad Prism 10.1.2。组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。

3 网络药理学结果分析

3.1 消痔丸活性成分筛选

根据化合物选取原则, 从 12 味药材中共选取了 34 个化合物, 见表 1。

3.2 化合物疾病靶点分析

预测得到消痔丸 34 个化合物的 562 个相关靶点; 得到痔疮疾病靶点 829 个; 将化合物靶点与疾病靶点取交集, 共得到 81 个交集靶点, 见图 1。

3.3 PPI 网络的构建及 GO、KEGG 分析

PPI 网络如图 2 所示, 该 PPI 网络中共有 79 个节点, 683 条边。经拓扑学分析筛选出度(degree)值排名前 15 位的靶点作为核心靶点, 见表 2。利用 Metascape 数据库和微生信平台进行交集靶点的 GO 和 KEGG 富集分析, 共得到 GO 功能条目 1 262 条和 KEGG 信号通路 158 条, 其中 GO 包括生物过程(BP) 1 111 项、细胞组分(CC) 41 种、分子功能(MF) 110 项。如图 3、4 所示, 依据 P 值升序排列, 每个模块中最具显著性的前 10 个条目进行可视化处理; 按 $P < 0.05$ 筛选与痔疮相关的前 20 条通路, 使用在线软件绘制通路气泡图。

表 1 化合物信息

Table 1 Compound information

编号	化合物	分子式	结构类型	来源
1	木兰花碱	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄	生物碱类	防己
2	异紫堇定碱	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄		防己
3	粉防己碱	C ₃₈ H ₄₂ N ₂ O ₆		防己
4	防己诺林碱	C ₃₇ H ₄₀ N ₂ O ₆		防己
5	小檗碱	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	黄酮类	三颗针皮
6	高良姜素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅		槐角
7	染料木素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅		槐角
8	丹皮酚	C ₉ H ₁₀ O ₃		牡丹皮
9	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀		牡丹皮
10	山柰酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₆		黄芪、槐角
11	芹菜素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅		黄芪
12	槐角苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀		槐角
13	芒柄花素	C ₁₆ H ₁₂ O ₄		黄芪、当归、槐角
14	芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆		当归、槐角
15	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇		槐角
16	大黄素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	蒽醌类	大黄
17	大黄酸	C ₁₅ H ₈ O ₆		大黄
18	大黄酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₄		大黄
19	芦荟大黄素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅		大黄
20	大黄素甲醚	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	2-异丁基苹果酸葡萄糖氧基苄酯类	大黄
21	番泻苷 B	C ₄₂ H ₃₈ O ₂₀		大黄
22	白及苷	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₇		白及
23	gymnoside III	C ₄₂ H ₅₈ O ₂₃		白及
24	没食子酸	C ₇ H ₆ O ₅	多酚类	地榆、大黄、槐角、牡丹皮
25	没食子酸乙酯	C ₉ H ₁₀ O ₅		槐角
26	鞣花酸	C ₁₄ H ₆ O ₈	三贴皂苷类	地榆
27	地榆皂苷 I	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₃		地榆
28	黄芪甲苷	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	单萜类	黄芪
29	芍药苷	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁		牡丹皮
30	白术内酯 II	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	倍半萜类	白术
31	异莲花掌苷	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	苯丁酮类	大黄
32	油酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	脂肪酸类	火麻仁
33	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	有机酸类	当归
34	Z-藁本内酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	苯酞类	当归



图 1 共有靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of common targets

3.4 “消痔丸 - 药材 - 成分 - 靶点 - 通路 - 药理作用 - 功效”网络构建

如图 5 所示，V 字形代表处方消痔丸，三角形代表药材，方形代表化学成分，四边形代表蛋白靶点，六边形代表通路，菱形代表药理作用及传统功效。该网络共有 221 个节点，1 015 条边。

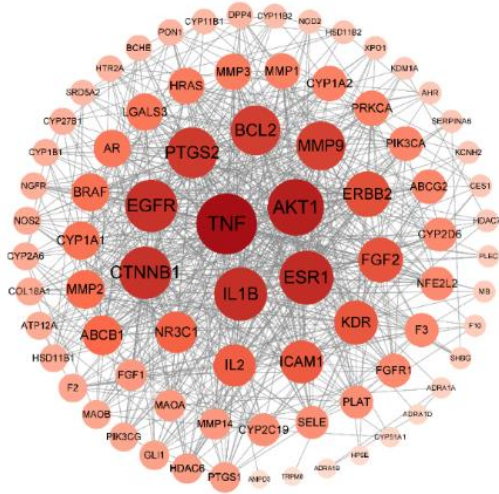


图 2 PPI 网络图

Fig. 2 PPI network diagram

表 2 核心靶点信息

Table 2 Core target information

靶点名称	degree	Uniprot ID	靶点名称	degree	Uniprot ID
TNF	51	P01375	MMP9	37	P14780
Akt1	46	Q96B36	ERBB2	33	P04626
ESR1	43	P11474	FGF2	32	P48798
IL-1B	42	P01584	KDR	31	P35968
CTNNB1	41	P35222	ICAM1	30	P05362
EGFR	41	P00533	IL-2	29	P60568
PTGS2	39	P35354	NR3C1	28	P04150
Bcl-2	38	P10415			

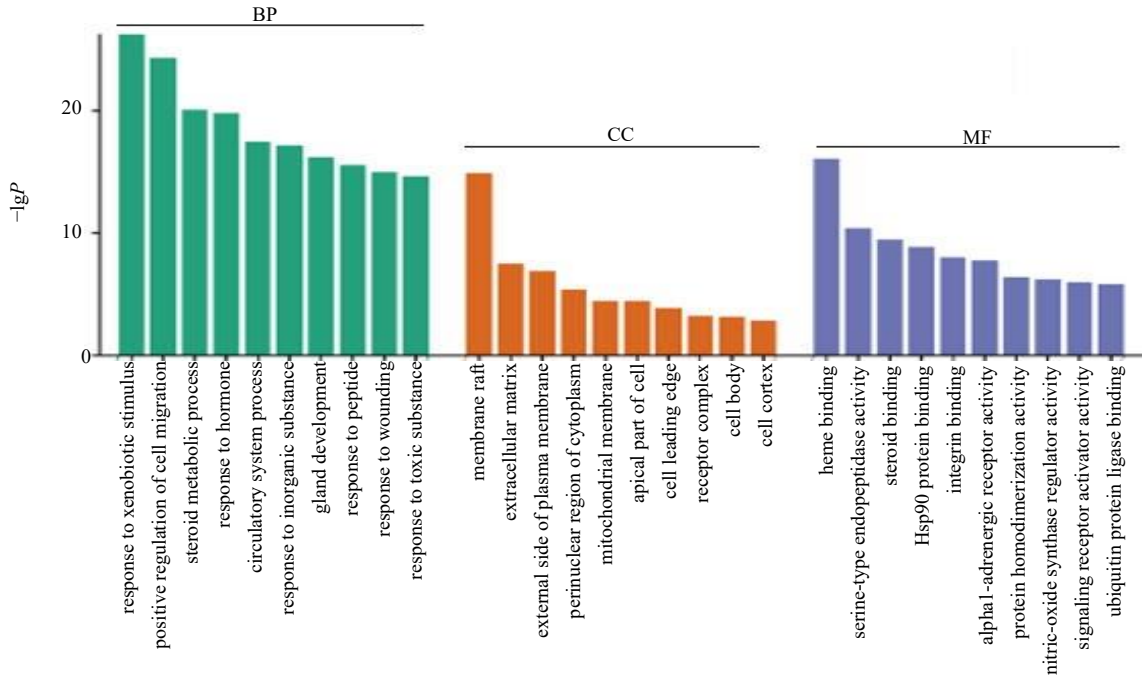


图 3 GO 功能分析图

Fig. 3 GO functional analysis diagram

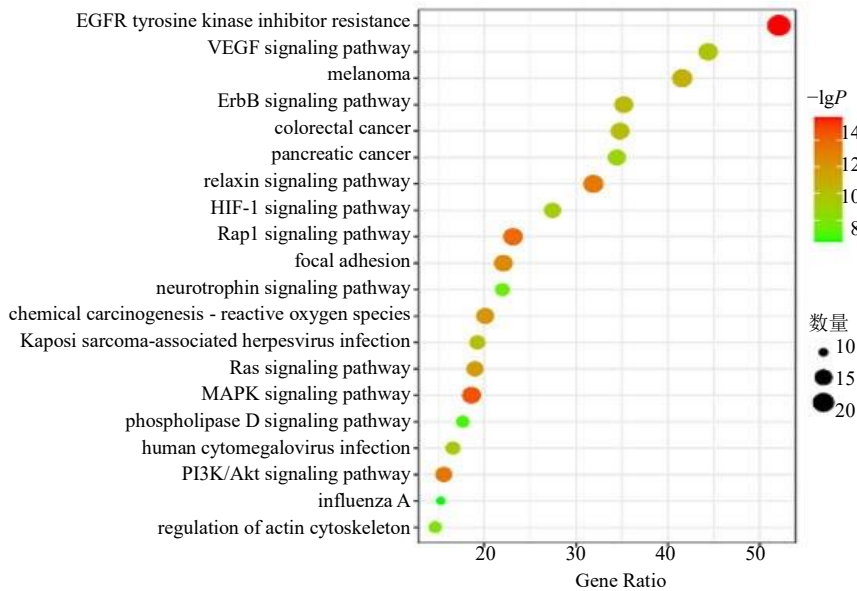


图 4 KEGG 通路富集图

Fig. 4 KEGG pathway enrichment diagram

与靶蛋白对接得分较高的对接结果可视化处理，见

图 6。

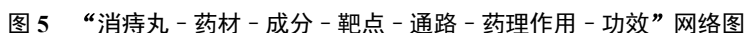


Fig. 5 Network diagram of “Xiaozhi Pills–medicinal materials–component–target–pathway–pharmacology–efficacy”

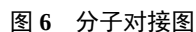
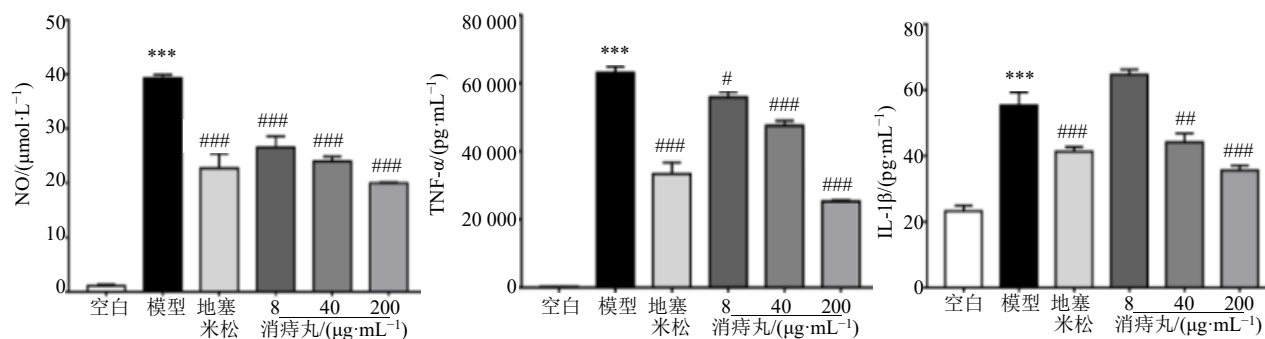


Fig. 6 Molecular docking diagrams

化合物均能显著降低 TNF- α 的含量($P<0.05$ 、 0.01 、

0.001)；芦荟大黄素和地榆皂苷 I 外，其余化合物

4.1.2 对 HUVEC 细胞通透性的影响 如图 9 所示,与模型组比较,消痔丸(200、1000 $\mu\text{g/mL}$)组内皮细胞的通透性显著降低($P<0.01$ 、 0.001);芦丁、槐角苷、芍药苷、异紫堇定碱在各给药浓度下内皮细胞的通透性均显著降低($P<0.001$);毛蕊

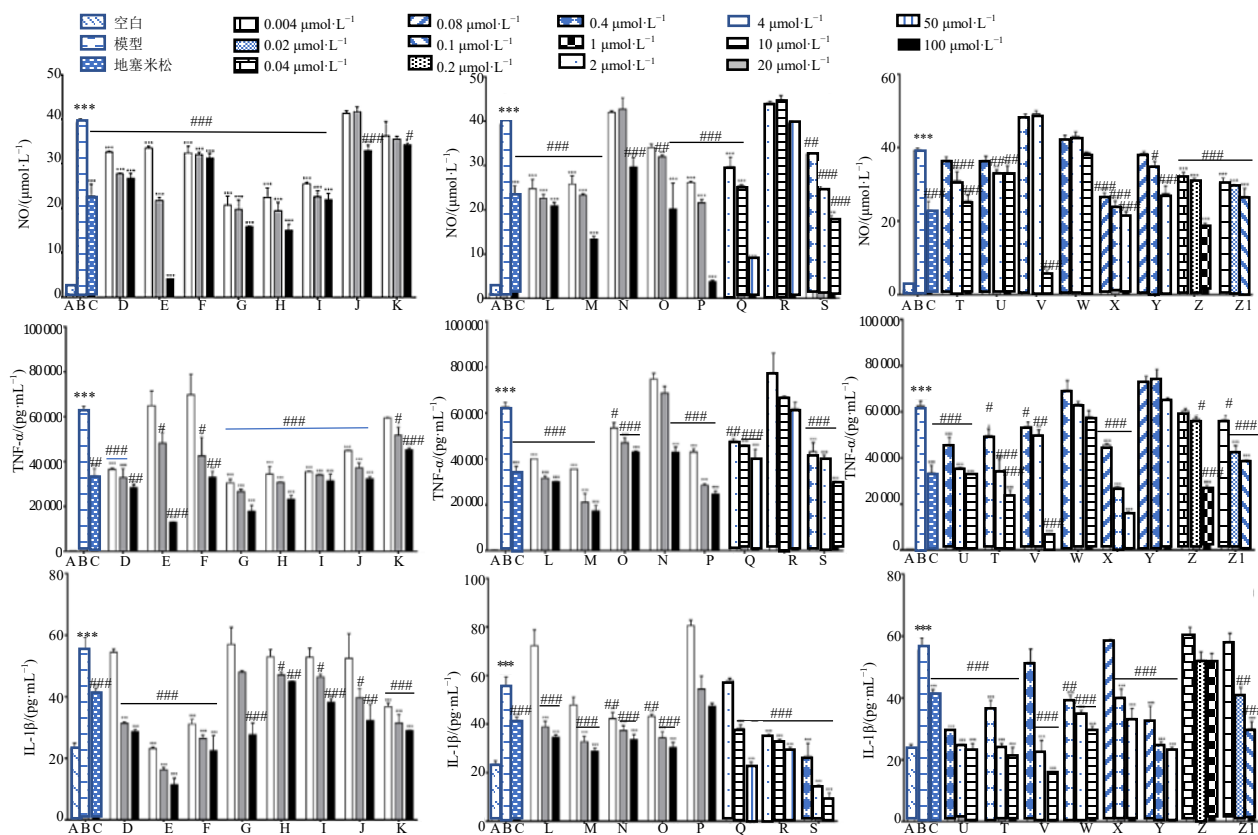


与空白组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

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

图 7 消痔丸对 NO、TNF- α 、IL-1 β 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7 Effects of Xiaozhi Pills on the levels of NO, TNF- α , and IL-1 β ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



A-空白, B-模型, C-地塞米松, D-毛蕊异黄酮葡萄糖苷, E-山奈酚, F-丹皮酚, G-白术内酯 II, H-阿魏酸, I-芦丁, J-槐角苷, K-芍药苷, L-异紫堇定碱, M-大黄素甲醚, N-木兰花碱, O-没食子酸, P-芦荟大黄素, Q-大黄素, R-黄芪甲苷, S-粉防己碱, T-防己诺林碱, U-小檗碱, V-藻本内酯, W-大黄酸, X-鞣花酸, Y-染料木素, Z-地榆皂苷 I, Z1-大黄酚。与空白组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

A-blank, B- model, C-dexamethasone, D-genistein glucoside, E-kaempferol, F-paeonol, G-atractylenolide II, H-ferulic acid, I-rutin, J-sophoricoside, K-paeoniflorin, L-isodiscocarpine, M-parietin, N-magnoflorine, O-gallic acid, P-aloe-emodin, Q-emodin, R-astragaloside IV, S-tetrandrine, T-fangchinoline, U-berberine, V-ligustilide, W-rhein, X-ellagic acid, Y-genistein, Z-ziyuglycoside I, Z1-chrysophanol; *** $P < 0.001$ vs blank group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 8 化合物对 NO、TNF- α 、IL-1 β 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 8 Effects of compounds on the levels of NO, TNF- α , and IL-1 β ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

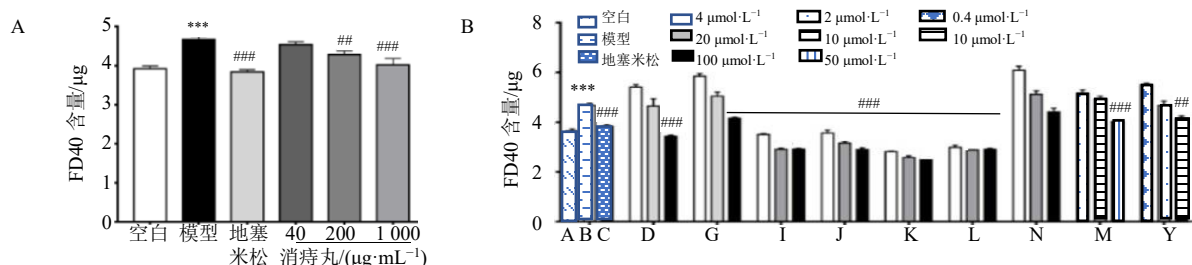
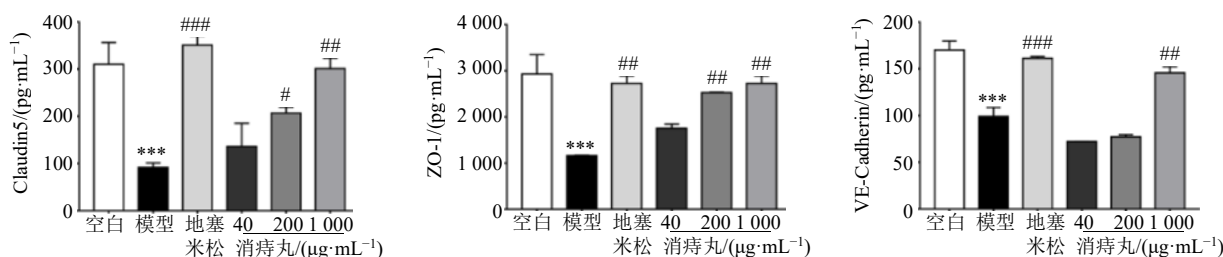


图 9 消痔丸 (A) 及化合物 (B) 对 HUVEC 通透性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 9 Effects of Xiaozhi Pills (A) and compounds (B) on HUVEC permeability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

异黄酮葡萄糖苷 (100 μmol/L) 组、白术内酯 II (100 μmol/L) 组、大黄素甲醚 (50 μmol/L) 组、染料木素 (10 μmol/L) 组内皮细胞通透性显著降低 ($P < 0.01, 0.001$)。

4.1.3 对 Claudin5、ZO-1、VE-Cadherin 表达水平的影响 如图 10 所示,与模型组比较,消痔丸(200、

1 000 μmol/L) 组上清液中 ZO-1、Claudin5 显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), 消痔丸 (1 000 μmol/L) 组 VE-Cadherin 蛋白含量均显著升高 ($P < 0.01$)。如图 11 所示,毛蕊异黄酮葡萄糖苷、染料木素、白术内酯 II 在一定给药浓度下可显著升高细胞上清 Claudin5 的含量 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$); 毛蕊异黄酮



与空白组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

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

图 10 消痔丸对 Claudin5、ZO-1、VE-Cadherin 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effects of Xiaozhi Pills on the protein expression of Claudin5, ZO-1, and VE-Cadherin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

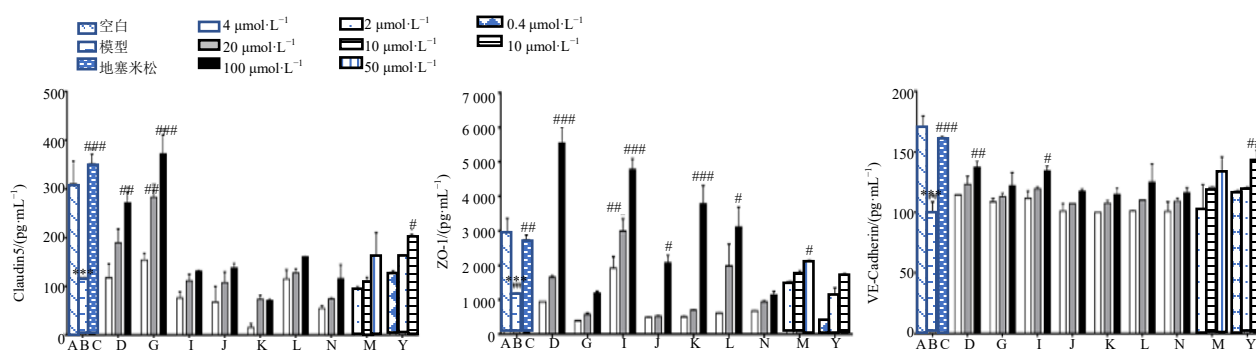


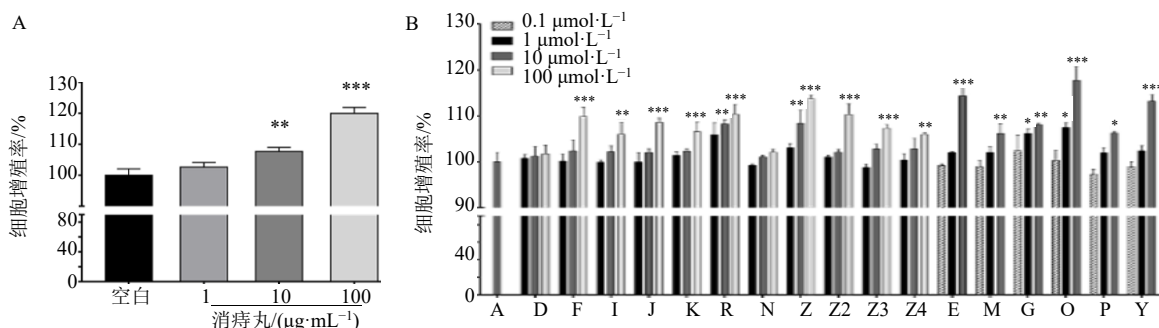
图 11 化合物对 Claudin5、ZO-1、VE-Cadherin 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 11 Effects of compounds on the protein expression of Claudin5, ZO-1, and VE-Cadherin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

葡萄糖苷、槐角苷、芍药苷、异紫堇定碱、大黄素甲醚、芦丁在一定给药浓度下可显著提高细胞上清 ZO-1 的含量 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)；毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芦丁、染料木素在高给药浓度时细胞上清 VE-Cadherin 的含量显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

4.2 消痔丸及单体化合物的伤口愈合活性

4.2.1 对细胞增殖率的影响 实验结果如图 12 所

示，与空白组相比，消痔丸 10、100 $\mu\text{g/mL}$ 组 HDF 细胞增殖率显著提高 ($P < 0.01$ 、 0.001)；丹皮酚、芦丁、槐角苷、芍药苷、白及苷、芒柄花素、手参苷 III、山柰酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素、染料木素、黄芪甲苷、地榆皂苷 I、白术内酯 II、没食子酸在一定给药浓度下均能显著提高细胞增殖率 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。



A-空白, D-毛蕊异黄酮葡萄糖苷, F-丹皮酚, I-芦丁, J-槐角苷, K-芍药苷, R-黄芪甲苷, N-木兰花碱, Z-地榆皂苷 I, Z2-白及苷, Z3-芒柄花素, Z4-手参苷 III, E-山柰酚, M-大黄素甲醚, G-白术内酯 II, O-没食子酸, P-芦荟大黄素, Y-染料木素; 与空白组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A-blank, D-genistein glucoside, F-paeonol, I-rutin, J-sophoricoside, K-paeoniflorin, R-astragaloside IV, N-magnoflorine, Z-ziyuglycoside I, Z2-militarine, Z3-formononetin, Z4-gymnosenoside III, E-kaempferol, M-parietin, G-atractylenolide II, O-gallic acid, P-aloe-emodin, Y-genistein; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs blank group.

图 12 消痔丸 (A) 及化合物 (B) 对 HDF 细胞增殖率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 12 Effects of Xiaozhi Pills (A) and compounds (B) on the proliferation rate of HDF cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

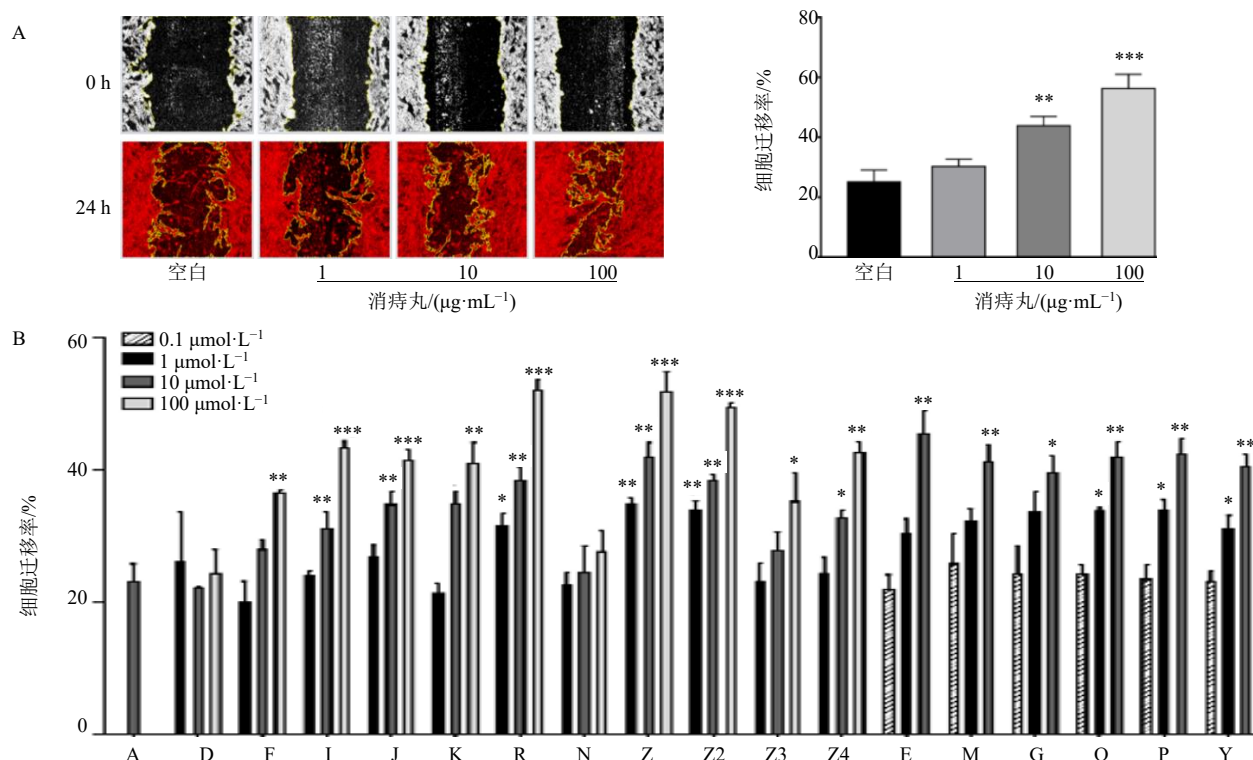
4.2.2 对细胞迁移率的影响 如图 13 所示，与空白组相比，消痔丸 10、100 $\mu\text{g/mL}$ 组 HDF 细胞迁移显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)；黄芪甲苷、地榆皂苷 I、白及苷、芦丁、槐角苷、芍药苷、手参苷 III、丹皮酚、芒柄花素、没食子酸、芦荟大黄素、染料木素、山柰酚、大黄素甲醚、白术内酯 II 在一定给药浓度下可显著提高 HDF 细胞迁移率 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

4.2.3 对 EGF、VEGF、TGF- $\beta 1$ 释放量的影响 由图 14 可知，与空白组相比，消痔丸 10、100 $\mu\text{g/mL}$ 组 EGF、VEGF、TGF- $\beta 1$ 含量均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。如图 15 所示，与空白组相比，芍药苷、黄芪甲苷、没食子酸、槐角苷、地榆皂苷 I、手参苷 III、芦丁、白及苷、芒柄花素、山柰酚、大黄素甲醚、白术内酯 II、芦荟大黄素、染料木素 EGF 含量显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。与空白组相比，地榆皂苷 I、黄芪甲苷、丹皮酚、芦丁、槐角苷、芍药苷、白及苷、芒柄花素、手参苷 III、大黄素甲醚、白术内酯 II、芦荟大黄素、染料木素、山柰酚、没食子酸 VEGF 含量显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、

0.001)。与空白组相比，芦丁、地榆皂苷 I、芒柄花素、丹皮酚、槐角苷、黄芪甲苷、手参苷 III、白术内酯 II、没食子酸、染料木素、大黄素甲醚、芦荟大黄素可显著提高 TGF- $\beta 1$ 含量 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

4.3 消痔丸及单体化合物的止痛活性

如图 16 所示，与阴性对照组相比，消痔丸 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 组 TRPA1、TRPV1 抑制率显著升高，消痔丸 100、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 组 HTR2A 抑制率均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001)。如图 17 所示，与阴性对照组相比，异紫堇定碱、染料木素、粉防己碱、防己诺林碱、大黄素、山柰酚、芍药苷在一定给药浓度下 HTR2A 抑制率显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，检测过程中发现消痔丸组及藁本内酯对 HTR2A 受体具有一定激动作用，因此其拮抗作用可能为假阳性结果；异紫堇定碱、藁本内酯、芦丁、芍药苷、没食子酸、黄芪甲苷、染料木素、粉防己碱、防己诺林碱、阿魏酸、白术内酯 II 在一定给药浓度下对 TRPA1 的抑制率显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)；丹皮酚、芍药苷、没食子酸、小檗碱、山

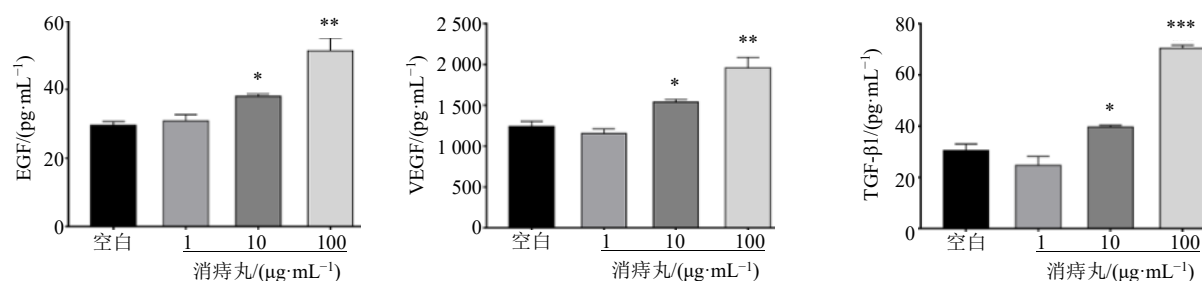


A-空白, D-毛蕊异黄酮葡萄糖苷, F-丹皮酚, I-芦丁, J-槐角苷, K-芍药苷, R-黄芪甲苷, N-木兰花碱, Z-地榆皂苷 I, Z2-白及苷, Z3-芒柄花素, Z4-手参苷 III, E-山柰酚, M-大黄素甲醚, G-白术内酯 II, O-没食子酸, P-芦荟大黄素, Y-染料木素; 与空白组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$.

A-blank, D-genistein glucoside, F-paeonol, I-rutin, J-sophoricoside, K-paeoniflorin, R-astragaloside IV, N-magnoflorine, Z-zyuglycoside I, Z2-militarine, Z3-formononetin, Z4-gymnoside III, E-kaempferol, M-parietin, G-atractylenolide II, O-gallic acid, P-aloe-emodin, Y-genistein; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs blank group.

图 13 消痔丸 (A) 及化合物 (B) 对 HDF 细胞迁移率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 13 Effect of Xiaozhi Pills (A) and compounds (B) on the migration rate of HDF cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与空白组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs blank group.

图 14 消痔丸对 EGF、VEGF、TGF- β 1 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

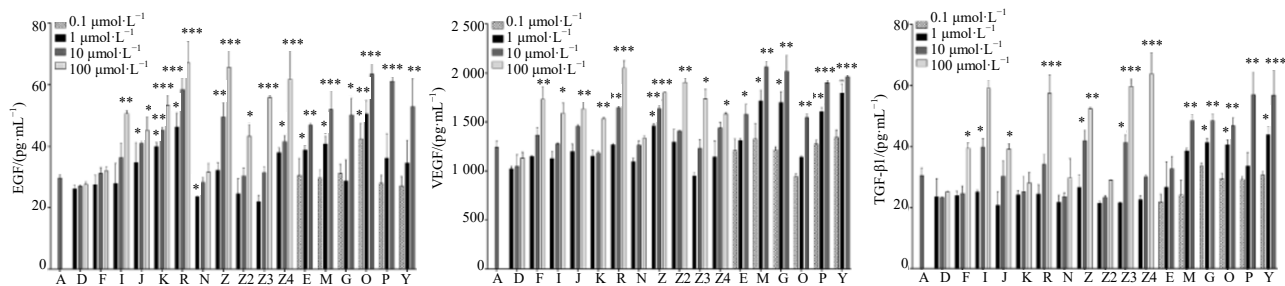
Fig. 14 Effects of Xiaozhi Pills on the levels of EGF, VEGF, and TGF- β 1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

奈酚、染料木素 100 $\mu\text{mol/L}$ 组对 TRPV1 的抑制率显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)。

4.4 消痔丸及单体化合物的止血活性

如图 18 所示, 与溶剂对照组比较, 消痔丸在一定给药浓度下可显著缩短 TT、APTT、PT, 并提高

FIB 含量与血小板聚集率 ($P < 0.05, 0.01$)。如图 19 所示, 与溶剂对照组比较, 山柰酚、鞣花酸、染料木素、地榆皂苷 I、白及苷在一定浓度下可显著缩短 TT, 而藁本内酯在一定浓度下可显著延长 TT ($P < 0.05, 0.01, 0.001$); 山柰酚、鞣花酸、染料木素、

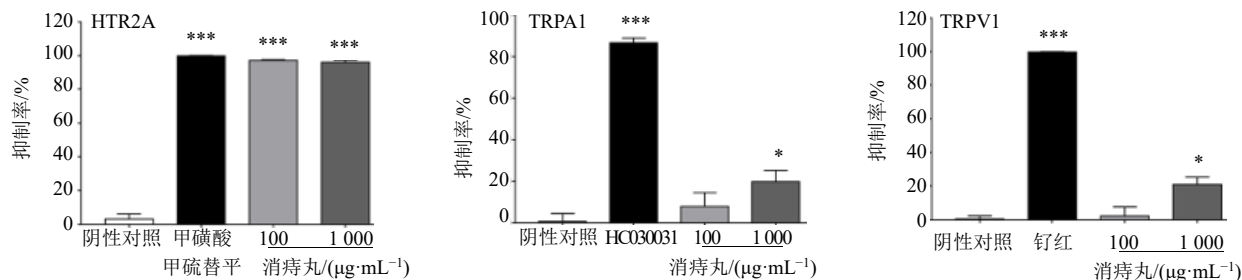


A-空白, D-毛蕊异黄酮葡萄糖苷, F-丹皮酚, I-芦丁, J-槐角苷, K-芍药苷, R-黄芪甲苷, N-木兰花碱, Z-地榆皂苷 I, Z2-白及苷, Z3-芒柄花素, Z4-手参苷 III, E-山柰酚, M-大黄素甲醚, G-白术内酯 II, O-没食子酸, P-芦荟大黄素, Y-染料木素; 与空白组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A-blank, D-genistein glucoside, F-paeonol, I-rutin, J-sophoricoside, K-paeoniflorin, R-astragaloside IV, N-magnoflorine, Z-ziyuglycoside I, Z2-militarine, Z3-formononetin, Z4-gymnoside III, E-kaempferol, M-parietin, G-atractylenolide II, O-gallic acid, P-aloe-emodin, Y-genistein; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs blank group.

图 15 化合物对 EGF、VEGF、TGF-β1 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 15 Effects of compounds on the levels of EGF, VEGF, and TGF-β1 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

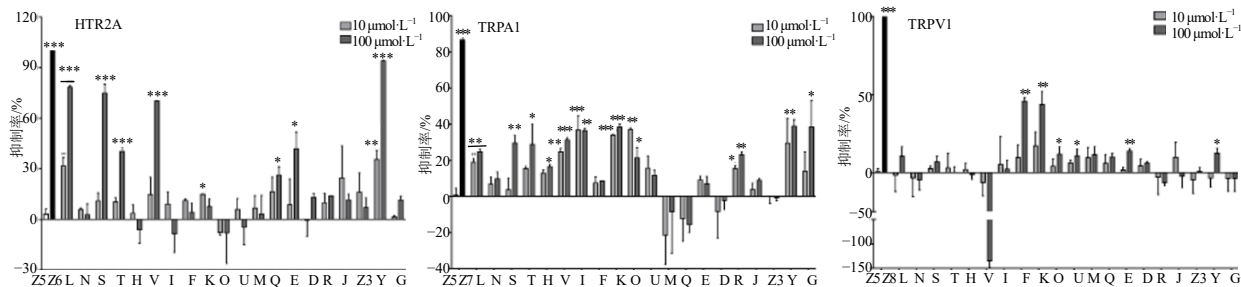


与阴性对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs negative control.

图 16 消痔丸对受体的拮抗作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=2$)

Fig. 16 Antagonistic effects of Xiaozhi Pills on receptors ($\bar{x} \pm s$, $n=2$)



Z5-阴性对照, Z6-甲磺酸甲硫替平, L-异紫堇定碱, N-木兰花碱, S-粉防己碱, T-防己诺林碱, H-阿魏酸, V-藁本内酯, I-芦丁, F-丹皮酚, K-芍药苷, O-没食子酸, U-小檗碱, M-大黄素甲醚, Q-大黄素, E-山柰酚, D-毛蕊异黄酮葡萄糖苷, R-黄芪甲苷, J-槐角苷, Z3-芒柄花素, Y-染料木素, G-白术内酯 II, Z7-HC030031, Z8-钨红; 与阴性对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

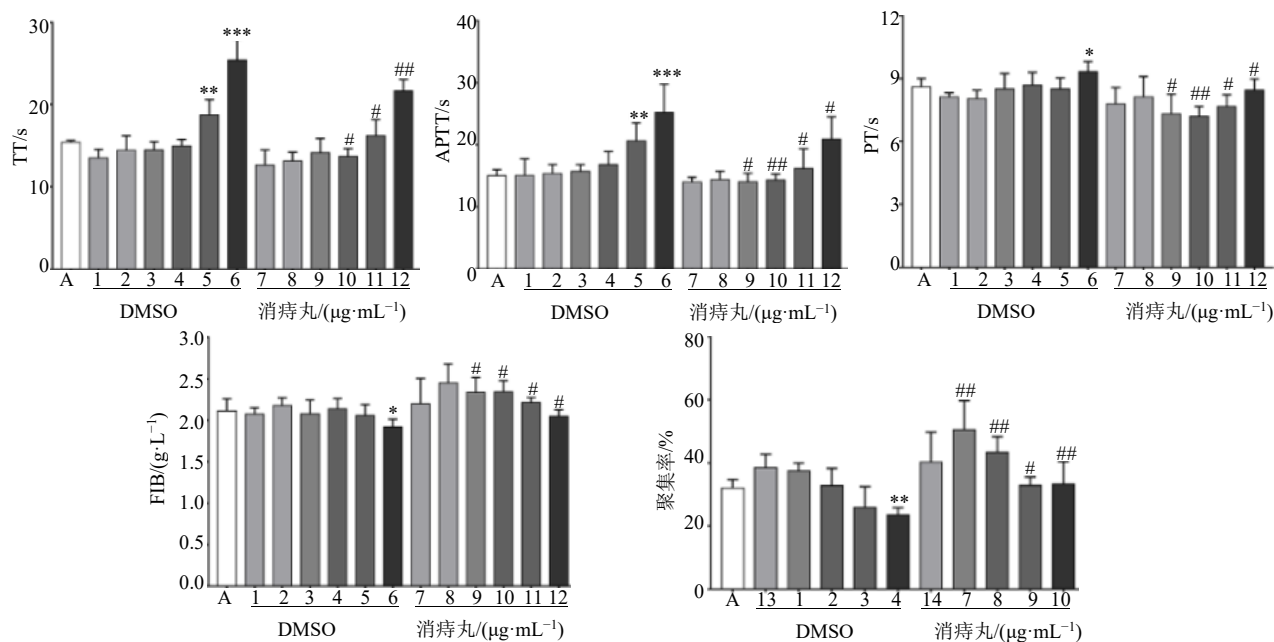
Z5-negative control, Z6-methiothepin mesylate salt, L-isodiscocarpine, N-magnoflorine, S-tetrandrine, T-fangchinoline, H-ferulic acid, V-ligustilide, I-rutin, F-paeonol, K-paeoniflorin, O-gallic acid, U-berberine, M-parietin, Q-emodin, E-kaempferol, D-genistein glucoside, R-astragaloside IV, J-sophoricoside, Z3-formononetin, Y-genistein, G-atractylenolide II, Z7-HC030031, Z8-ruthenium red; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs negative control.

图 17 化合物对 3 个受体的拮抗作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=2$)

Fig. 17 Antagonistic effects of compounds on receptors ($\bar{x} \pm s$, $n=2$)

地榆皂苷 I、白及苷在一定浓度时可显著缩短 APTT, 而藁本内酯在一定浓度下可显著延长 APTT

($P < 0.05$, 0.01, 0.001); 山柰酚、鞣花酸、染料木素、地榆皂苷 I、白及苷在一定浓度时可显著缩短

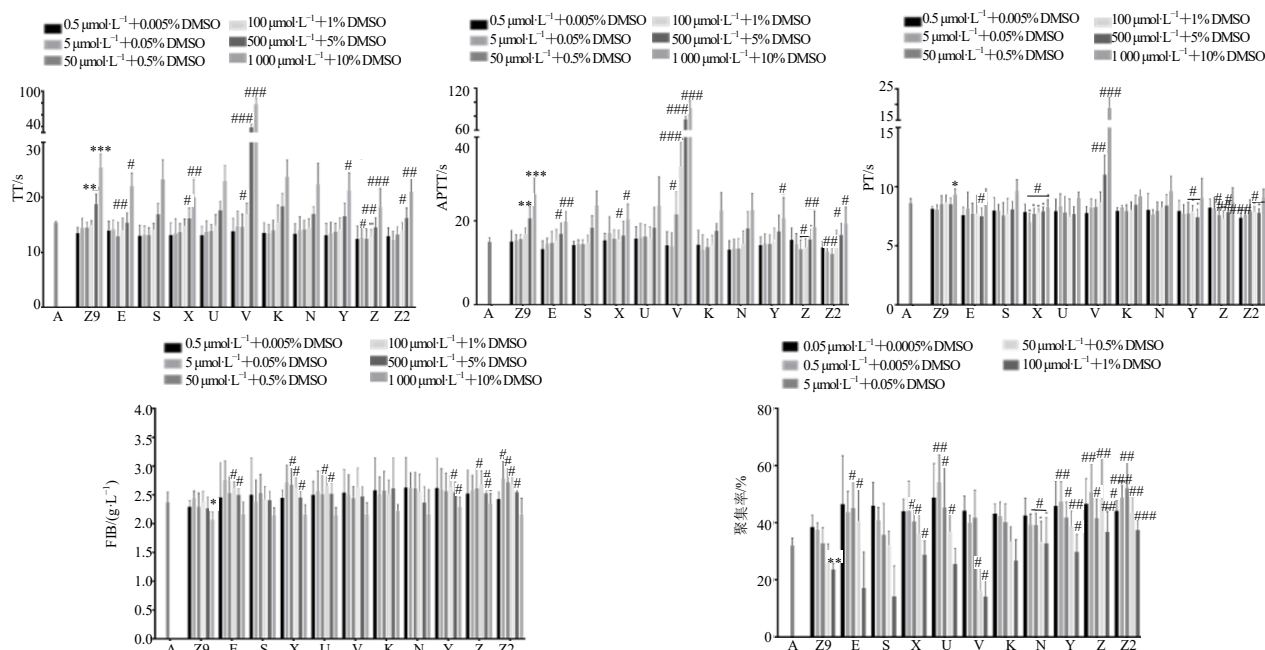


1-0.005% DMSO, 2-0.05% DMSO, 3-0.5% DMSO, 4-1% DMSO, 5-5% DMSO, 6-10% DMSO, 7-0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 8-5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 9-50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 10-100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 11-500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 12-1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 13-0.000 5% DMSO, 14-0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 与空白组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与 DMSO 组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ 。

1 - solvent control 0.005% DMSO, 2 - solvent control 0.05% DMSO, 3 - solvent control 0.5% DMSO, 4 - solvent control 1% DMSO, 5 - solvent control 5% DMSO, 6 - 10% DMSO, 7 - 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 8 - 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 9 - 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 10 - 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 11 - 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 12 - 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 13 - 0.000 5% DMSO, 14 - 0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs blank group, # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs DMSO group.

图 18 消痔丸对血浆凝血四项及血小板聚集率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 18 Effects of Xiaozhi Pills on the four plasma coagulation parameters and platelet aggregation rate ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)



A-空白, Z9-溶剂对照, E-山柰酚, S-粉防己碱, X-鞣花酸, U-小檗碱, V-藁本内酯, K-芍药苷, N-木兰花碱, Y-染料木素, Z-地榆皂苷 I, Z2-白及苷; 与空白组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与溶剂对照组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ 。

A-blank, Z9-solvent control, E-kaempferol, S-tetrandrine, X-ellagic acid, U-berberine, V-ligustilide, K-paeniflorin, N-magnoflorine, Y-genistein, Z-ziyuglycoside I, Z2-militarine; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs blank group, # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs Xiaozhi Pills group.

图 19 化合物对血浆凝血四项及血小板聚集率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 19 Effects of compounds on the four plasma coagulation parameters and platelet aggregation rate ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

PT, 而藁本内酯在一定浓度下可显著延长 PT ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 山柰酚、鞣花酸、小檗碱、染料木素、地榆皂苷 I、白及苷在一定浓度时 FIB 含量显著增加 ($P < 0.05$); 山柰酚、鞣花酸、小檗碱、木兰花碱、染料木素、地榆皂苷 I、白及苷在一定给药浓度下血小板聚集率显著升高, 而藁本内酯在一定浓度下可显著降低血小板聚集率 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

5 讨论

中医认为痔的发病为阴阳失调, 脏腑气血虚损, 再加外邪 (湿、热、风、燥)、内伤 (情志内伤、饮食不节) 等作用, 致使气血失调, 络脉阻滞, 瘀血浊气流注肛门, 结聚成块成痔^[3]。临床多见局部感染、发炎、疼痛、发痒、渗血等症状。本研究通过分析网络药理结果发现消痔丸主要成分作用的蛋白靶点及通路 with 消肿生肌、清热润便、补气固脱、止血、止痛等相关, 体现了消痔丸治疗痔病多成分、多靶点、多途径的作用机制, 利用分子对接和体外实验进行了消痔丸药理作用的验证实验, 筛选出了消痔丸的药效物质基础。

5.1 抗炎消肿功效

痔疮的发生、发展及愈合过程伴随一系列炎症反应, 炎症细胞及其释放的介质可致毛细血管扩张、通透性增加^[4]。多种炎症因子和信号通路参与其中, TNF- α 由活化的 T 细胞和巨噬细胞产生, 能促进炎症细胞聚集、活化及介质释放, 导致内皮功能障碍, 加重炎症, 是急性炎症的起始因子^[5]。IL-1 β 作为重要促炎因子, 通过激活内皮细胞增加黏附分子表达, 诱发炎症反应, 并与 TNF- α 相互促进, 引起发热等表现^[6]。LPS 和/或细胞因子等刺激可诱导单核巨噬细胞高表达一氧化氮合成酶, 产生过量 NO, 进而引起细胞毒性与组织损伤等炎症反应^[7]。PGE₂ 是致炎致痛物质, 可引发炎症细胞浸润、增加血管通透性, 并激活或敏化周围伤害感受器, 导致局部疼痛^[8]。血管内皮细胞连接的完整性对维持细胞的正常通透性至关重要, 其中 VE-Cadherin、Claudin-5、ZO-1 是连接的关键蛋白, 对血管屏障功能及通透性调节意义重大^[9-10]。网络药理结果表明, 粉防己碱、防己诺林碱、木兰花碱、黄芪甲苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、大黄素等成分可作用于 IL-2、IL-1 β 、TNF、PTGS1、PTGS2 等蛋白靶点, 参与调节 TNF 信号通路、NF- κ B 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路、

磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路等发挥抗炎消肿作用^[11-12], 体外细胞实验表明消痔丸及单体化合物可显著降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞上清液 NO、TNF- α 、IL-1 β 的分泌。

5.2 生肌功效

痔疮发病后, 常出现局部组织损伤、炎症因子过度表达以及创面愈合困难。MAPK 可将胞外炎症信号传入胞内, 诱导成纤维细胞、内皮细胞、表皮细胞等增殖、分化并向伤口迁移, 刺激多种生长因子分泌, 促进肉芽新生及溃疡愈合^[13]。EGFR 是细胞膜上具有酪氨酸激酶活性的糖蛋白, 通过调控细胞凋亡、增殖、分化、迁移及周期循环, 加速创面细胞分裂与迁移, 促进愈合^[14]; VEGF 作为血管内皮特异性生长因子, 可诱导血管新生: 促进内皮细胞分裂与存活, 增加毛细血管通透性, 为内皮迁移及血管形成提供基础^[15]。TGF- β 是一种多功能生长因子, 通过调节细胞增殖、迁移、分化及免疫功能参与创面修复全过程, 此外, TGF- β 还能直接诱导成纤维细胞向肌成纤维细胞转化^[16]。网络药理结果表明, 木兰花碱、异紫堇定碱、高良姜素、染料木素、山柰酚、槲皮素、鞣花酸等可作用于 EGFR、KDR、MMP9、SRC 等靶点, 参与调节 MAPK 信号通路、PI3K/Akt 信号通路、VEGF 信号通路、叉头框蛋白 O (FoxO) 信号通路、mTOR 信号通路等发挥生肌作用^[17-18]。体外细胞实验表明消痔丸及单体化合物可显著促进 HDF 细胞增殖与迁移, 提高 EGF、VEGF、TGF- β 1 因子表达量。

5.3 止痛功效

组织损伤后, 周围与中枢神经系统敏感性改变是疼痛的主要原因。损伤可诱发神经末梢释放 P 物质, 导致局部血管通透性增高, 组织水肿; 同时, 受损组织释放的炎性致痛物质不仅直接刺激伤害感受器, 还可引起神经活化与敏化, 使阈下刺激也能引发疼痛^[19]。HTR2A 受体活化后促使 Ca²⁺ 内流, 激活蛋白激酶 C, 导致神经元持续或异常兴奋, 产生痛敏^[20]。TRP (如 TRPV1、TRPA1) 通道可响应温度、pH、炎性介质等刺激, 参与相关病理性疼痛过程^[21]。其中, TRPV1 分布于消化道多种组织, 能被辣椒素、高热、炎症介质、低 pH 等激活^[22]; TRPA1 同可被低温、芥子油、炎症代谢等激活, 介导急性神经源性炎症与疼痛^[23]。网络药理结果显示, 大黄酚、异莲花掌苷、芍药苷、藁本内酯等成分作用于 PTGS1、PTGS2、HTR2A、MMP3、MMP9

等靶点,参与调节含血清素的神经突触、炎症介质对 TRP 通道的调节、Fc epsilon RI 信号通路等发挥止痛作用^[24-25]。体外细胞实验表明,消痔丸及其单体化合物对 HTR2A、TRPV1、TRPA1 均有一定拮抗作用。

5.4 止血功效

痔疮出血主要因曲张的痔静脉以及排使用力所致:隆起的痔静脉被擦破时,血管内压力升高导致破裂^[26-27],同时痔静脉扩张、充血,黏膜破损,血液外流^[28]。内皮细胞生成的前列环素(PGI₂)与内皮衍生松弛因子(EDRF)可抑制血小板聚集并扩张血管^[29];而血小板释放的血栓烷 A₂(TXA₂)、5-羟色胺等物质则使血管收缩。纤维蛋白原等凝血因子与损伤的内皮细胞结合,协同内皮细胞分泌的组织因子构成原位凝血,增强止血作用^[30]。钙离子在此过程中至关重要,可激活内外源性凝血系统及血小板,促使纤维蛋白原转化为纤维蛋白,介导血小板聚集。网络药理结果发现,没食子酸、鞣花酸、地榆皂苷 I、芦丁、白及苷、手参苷 III 等化学成分可能作用于 VEGFA、F₂、F₃、F₁₀、EGFR、ESR1、AHR 等靶点,参与调节钙信号通路、Rap1 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、Th17 细胞分化、花生四烯酸代谢和血小板激活等发挥止血作用^[31-32]。体外实验结果表明,消痔丸及单体化合物可显著缩短 TT、APTT、PT,增加血浆 FIB 含量,并提高血小板聚集率。

综上,消痔丸主要通过抗炎消肿、促进伤口愈合、止痛、止血等多个药理作用治疗痔病,初步确定粉防己碱、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、芍药苷、没食子酸、芦丁、丹皮酚、小檗碱、槐角苷、白术内酯 II、阿魏酸、藁本内酯、异紫堇定碱、木兰花碱、染料木素、地榆皂苷 I、黄芪甲苷、鞣花酸、山柰酚、防己诺林碱、大黄酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、白及苷、芒柄花素、手参苷 III 为药效物质基础,为消痔丸的临床合理应用提供了科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 董玉玲. 自制中药化痔止痛丸对痔疮的治疗疗效研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(83): 158.
- [2] 李翔, 罗平. 四大民族医药治疗痔疮研究进展[J]. 亚太传统医药, 2023, 19(3): 57-60.
- [3] 何梦瑶, 刘薛尧, 黎海龙. 痔的中医治疗研究进展[J].

中医学, 2022, 11(5): 952-958.

- [4] 邱素华, 朱忠宁, 陈雪彦, 等. 五味化痔促进溃疡愈合的药效学研究[J]. 神经药理学报, 2023, 13(2): 1-5.
- [5] 黄泽森, 韩梁, 韩彦琪, 等. 中药防治痔病作用机制研究进展[J]. 中国现代中药, 2024, 26(8): 1432-1442.
- [6] Liu B S, Bai M, Peng M F, *et al.* Anti-inflammatory effect and the effect on acute pharyngitis rats model of compound Lobelia oral liquid[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2019, 26(3): 577-581.
- [7] Singh G, Kaur J, Kaur M, *et al.* Anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of imperatorin: Evidences for involvement of COX-2, iNOS, NFκB and inflammatory cytokines[J]. *Int J Neurosci*, 2020, 130(2): 176-185.
- [8] 郭麒麟, 吴海波, 毛毛, 等. 四氢孕酮抑制脊髓 p-ERK/PGE₂ 信号通路缓解化疗导致的神经病理性疼痛[J]. 医学研究与战创伤救治, 2025, 38(8): 791-797.
- [9] 王咏琪, 魏余灼, 刘丽, 等. 黄连-木香介导糖萜重塑保护肠道血管内皮屏障缓解溃疡性结肠炎小鼠肠道炎症[J]. 中国中药杂志, 2026 (5): 1273-1281.
- [10] 蓬文雅. 脂质金纳米颗粒靶向递送基因表达质粒修复血管内皮细胞连接[D]. 济南: 山东师范大学, 2023.
- [11] 韩世诚, 王智森, 高飞, 等. 五味化痔胶囊对痔模型大鼠炎症因子和 PI3K/AKT/NF-κB 信号通路的影响[J]. 河北中医药学报, 2023, 38(6): 1-6.
- [12] Zhang H X, Yang J J, Zhang S A, *et al.* HIF-1α promotes inflammatory response of chronic obstructive pulmonary disease by activating EGFR/PI3K/AKT pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(18): 6077-6084.
- [13] Konstantinou E, Zagoriti Z, Pyriochou A, *et al.* Microcurrent stimulation triggers MAPK signaling and TGF-β1 release in fibroblast and osteoblast-like cell lines[J]. *Cells*, 2020, 9(9): 1924.
- [14] 李艳娜, 张富源, 程伟峰, 等. 兴安升麻醇提物成分分析及基于网络药理学探讨其促进皮肤伤口愈合的作用机制[J]. 食品工业科技, 2023, 44(24): 12-22.
- [15] 申佳玉, 魏欣, 卞轶夫, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨银杏叶促进伤口愈合的作用[J]. 现代口腔医学杂志, 2025, 39(4): 284-290.
- [16] 訾怡. 人脐带间充质干细胞外泌体通过 TGFβ1-Smad 通路促进弹性蛋白生成促进急性皮肤伤口愈合[D]. 延边: 延边大学, 2025.
- [17] Basile M S, Cavalli E, McCubrey J, *et al.* The PI3K/Akt/mTOR pathway: A potential pharmacological target in COVID-19[J]. *Drug Discov Today*, 2022, 27(3): 848-856.
- [18] 尹园缘, 余炼, 刘颖, 等. 象皮生肌膏对肛瘘术后创面修复及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响[J]. 现代生物医学进展, 2024, 24(5): 813-821.
- [19] 曹庆宝, 李春耕, 刘庆余. 补虚生肌法对痔瘘术后创面

- 愈合、炎症因子及疼痛介质的影响 [J]. 山东中医杂志, 2022, 41(1): 62-67.
- [20] Alba-delgado C, Mountadem S, Mermet-Joret N, *et al.* 5-HT(2A) receptor-induced morphological reorganization of PKC γ -expressing interneurons gates inflammatory mechanical allodynia in rat [J]. *J Neurosci*, 2018, 38(49): 10489-10504.
- [21] 王娅, 李瑞鑫, 葛朝明. 瞬时受体电位通道与 Sigma-1 受体相互作用及其调控疼痛的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2024, 39(1): 263-268.
- [22] 莫华琚, 李俊. 基于 CiteSpace 的 TRPV1 与疼痛相关研究的可视化分析 [J]. 右江民族医学院学报, 2024, 46(2): 233-237.
- [23] 顾乐盈, 杨妞妞, 于康英, 等. 白芷在神经病理性疼痛中对 MrgprD-TRPA1 通路的调控作用分析 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(2): 219-229.
- [24] Du Y Y, Chen J, Shen L, *et al.* TRP channels in inflammatory bowel disease: Potential therapeutic targets [J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 203: 115195.
- [25] 刘若琳, 解雯, 郑雪平. 花椒栓对肛瘘术后创面愈合及其对创面微环境的影响 [J]. 中医药临床杂志, 2024, 36(4): 769-773.
- [26] 周金宵, 丛慧芳. 自拟参芪失笑止血汤治疗气虚血瘀型崩漏 52 例 [J]. 云南中医中药杂志, 2014, 35(2): 46-47.
- [27] 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.
- [28] 张凤丹. 内镜套扎治疗肝硬化伴痔静脉曲张破裂出血的临床观察 [D]. 大连: 大连医科大学, 2022.
- [29] 吴敏. 益母缩宫颗粒对药物不全流产大鼠 PGI₂/TXA₂ 系统、凝血功能影响的实验研究 [D]. 四川: 西南医科大学, 2020.
- [30] 高玉阳. 中药 YZ 止血作用及其机制的初步研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
- [31] 赵娅菲, 陈永莹, 孙盼, 等. CaMKII δ 在凝血酶及凝血酶受体激活肽介导的血小板活化中的作用 [J]. 中国输血杂志, 2025, 38(10): 1307-1312.
- [32] 胡静. 基于斑马鱼血栓模型探究 Wip1 对血栓形成的影响及机制研究 [D]. 赣州: 赣南医科大学, 2025.

[责任编辑 高源]