

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

孙 科¹, 李 新^{2,3,4#}, 韩彦琪^{2,3,4}, 王春芳^{2,3,4,5}, 黄泽森^{2,3,4,5}, 彭亚倩^{2,3,4,5}, 徐 旭^{2,3,4}, 许 浚^{2,3,4}, 孙 岩¹, 赵专友^{2,3,4}, 张铁军^{2,3,4*}, 柴国林^{1*}

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, 天津市中药质量标志物重点实验室, 天津 300462

3. 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, 天津 300462

4. 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

5. 天津中医药大学, 天津 301617

摘 要: **目的** 探讨消痔丸对巴豆油诱导大鼠肛门肿胀模型的药效作用及其作用机制。**方法** 雄性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组及消痔丸低、中、高剂量 (0.81、1.62、3.24 g/kg) 组和柑橘黄酮片 (0.27 g/kg) 组和痔炎消片 (0.86 g/kg) 组, 每组 20 只, 连续 ig 给药 7 d, 于给药第 4 天, 采用巴豆油涂抹肛管诱发肛门肿胀至 72 h, 通过测量肛门肿胀面积初步评估各给药组治疗效果; 通过采集大鼠血液、肛门直肠组织进行生化指标及组织病理学等检测, 评价消痔丸治疗效果及作用机制。**结果** 与模型组比较, 消痔丸组大鼠肛周肿胀、黏液溢出、便秘等症状明显减轻, 肛肠指数和血管通透性均显著降低 ($P<0.001$), 肛门直肠组织鳞状上皮细胞缺失、炎性细胞浸润、水肿等现象明显减少; 血中白细胞数量及中性粒细胞、单核细胞比例显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001), 淋巴细胞比例显著升高 ($P<0.05$); 血清及肛门直肠组织中白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂)、 γ -干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001); 肛门直肠组织中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)、IFN- γ 、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 基因表达显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。**结论** 消痔丸对巴豆油诱导的急性痔疮模型治疗作用显著, 其对于痔疮引起的肛门肿胀、炎症反应、直肠血管通透性增加等均有很好的治疗效果。

关键词: 消痔丸; 巴豆油; 痔病; 肛门肿胀; 炎症; 血管通透性

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)20-6734-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.20.017

Pharmacodynamic effect and mechanism of Xiaozhi Pills in croton oil preparation induced hemorrhoidal model in rats

SUN Ke¹, LI Xin^{2,3,4}, HAN Yan-qi^{2,3,4}, WANG Chun-fang^{2,3,4,5}, HUANG Ze-sen^{2,3,4,5}, PENG Ya-qian^{2,3,4,5}, XU Xu^{2,3,4}, XU Jun^{2,3,4}, SUN Yan¹, ZHAO Zhuan-you^{2,3,4}, ZHANG Tie-jun^{2,3,4}, CHAI Guo-lin¹

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

2. Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

3. National & Local United Engineering Laboratory of Modern Preparation and Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

4. National Key Laboratory of Druggability Evaluation and Systematic Translational Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

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

收稿日期: 2023-02-02

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

作者简介: 孙 科 (1990—), 男, 硕士, 工程师, 研究方向为中药学。E-mail: skwind@163.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研究。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

#共同第一作者: 李 新 (1992—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向为天然产物及中药复方药理及机制探讨。E-mail: lix6@tjipr.com

Abstract: Objective To explore the pharmacodynamic effect and mechanism of Xiaozhi Pills (消痔丸) on croton oil preparation induced hemorrhoidal rats model. **Methods** Male SD rats were randomly grouped into control group, model group, Xiaozhi Pills low-, medium-, high-dose (0.81, 1.62, 3.24 g/kg) groups, Citrus Bioflavonoids Tablets (柑橘黄酮片, 0.27 g/kg) group and Zhiyanxiao Tablets (痔炎消片, 0.86 g/kg) group, with 20 rats in each group. Rats were continuous ig administration for 7 d, on 4th day of administration, croton oil preparation was applied to the anal canal to induce anal swelling for 72 h. The treatment effect of each treatment group was preliminarily evaluated by measuring the area of anal swelling; Blood and anorectal tissues of rats were collected for biochemical indicators and histopathology tests to evaluate the therapeutic effect and mechanism of Xiaozhi Pills. **Results** Compared with model group, the symptoms of perianal swelling, mucus overflow and constipation in Xiaozhi Pills group were significantly reduced, anorectal index and vascular permeability were significantly decreased ($P < 0.001$); The absence of squamous epithelial cells, inflammatory cell infiltration and edema in anal and rectal tissues were significantly reduced. The number of white blood cells and proportion of neutrophils and monocytes in blood were significantly decreased ($P < 0.01, 0.001$), while the proportion of lymphocytes was significantly increased ($P < 0.05$). Levels of interleukin-6 (IL-6), IL-1 β , tumor necrosis factor- α (TNF- α), prostaglandin E₂ (PGE₂), interferon- γ (IFN- γ) and nitric oxide (NO) in serum and anorectal tissue were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01, 0.001$); IL-6, IL-1 β , TNF- α , cyclooxygenase-2 (COX-2), IFN- γ and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expressions in anal and rectal tissues were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** Xiaozhi Pills has a significant therapeutic effect on croton oil preparation induced acute hemorrhoids model, and it has a good therapeutic effect on anal swelling, inflammatory reaction, rectal vascular permeability increase caused by hemorrhoids.

Key words: Xiaozhi Pills; croton oil preparation; hemorrhoidal disease; hemorrhoidal swelling; inflammation; vascular permeability

痔病是一种肛门直肠疾病, 定义为正常肛门垫的症状性增大和远端移位。这些软垫的任何出血、增大和突出以及黏膜脱垂都可能导致病理性痔病。痔病是最常见的直肠疾病, 根据痔疮所在位置可以分为外痔、内痔和混合痔。痔疮又称痔核, 其实质部分主要由扩张、壁薄且充满滞留血液的异常静脉组成, 静脉内常有血栓形成, 此外还常见数量不等的浆细胞、淋巴细胞、中性粒细胞浸润及肉芽肿等炎症变化, 表面可有溃疡形成^[1]。临床常用的治疗方法有保守治疗、门诊手术治疗和外科手术治疗, 但手术治疗容易复发, 并伴有不良反应。

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。消痔丸在临床应用效果较好, 且未见明显不良反应, 但其现代药理机制的阐释、作用特点挖掘等亟待完善。因此, 本研究采用巴豆油建立急性痔疮大鼠模型, 探讨消痔丸对急性痔疮肿胀、炎症因子、致痛因子、血管通透性及机体免疫等方面的影响。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 140 只, 5 周龄, 体质量

180~200 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。动物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 °C, 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。实验动物经天津天诚新药评价有限公司实验动物伦理委员会批准(批准号 No.2022081601)。

1.2 药品与试剂

消痔丸(批号 210712, 0.04 g/丸)由兰州佛慈制药股份有限公司提供; 柑橘黄酮片[批号 2019224, 500 mg/片(以总黄酮计)]购自法国施维雅药厂; 痔炎消片(批号 220411, 0.53 g/片)购自马应龙药业集团股份有限公司; 巴豆油(批号 C13225401)购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 伊文思蓝(批号 C14203506)购自上海麦克林生化科技股份有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 20220806)购自北京索莱宝科技有限公司; 一氧化氮(nitric oxide, NO)检测试剂盒(批号 061322220801)购自碧云天生物技术有限公司; 大鼠白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)ELISA 试剂盒(批号 2207271)、大鼠前列腺素 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)ELISA 试剂盒(批号 2208251)、大鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)ELISA 试剂盒(批号 2208281)、大鼠 IL-1 β ELISA

试剂盒(批号 2208261)均购自上海西唐生物科技有限公司;大鼠 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)ELISA 试剂盒(批号 KL02RX6V8758)购自美国 Immunoway 公司;环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、GAPDH 基因引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;反转录试剂盒(批号 63347620)、PowerUp SYBR Green Master Mix(批号 50837000)购自瑞士罗氏诊断公司;苏木素染色液(货号 ZLI-9610)、伊红染色液(货号 ZLI-9613)购自中杉金桥公司。

1.3 仪器

BC-2800Vet 型全自动血液细胞分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);SpectraMaxM5 型酶标仪(美国 MolecularDevices 公司);WD-2103B 型自动洗板机(北京六一生物科技有限公司);BioPhotometer D30 型核酸蛋白测定仪(德国 Eppendorf 公司);T100 型 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);LightCycler 480 型荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司);TP1020 型病理脱水机、HistoCore MULTICUT 型病理切片机(德国 Leica 公司);CKX43 型正置光学显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、给药与造模

SD 大鼠适应期喂养 1 周后,随机分为对照组、模型组及消痔丸低、中、高剂量(0.81、1.62、3.24 g/kg,相当于 1/2、1、2 倍临床剂量)组及柑橘黄酮片(参照说明书急性发作期使用方法,即前 3 d 0.18 g/kg,后 4 d 0.27 g/kg)组和痔炎消片(0.86 g/kg)组,每组 20 只。每组中 10 只用于生化指标、病理等检测,另外 10 只用于肛门直肠伊文思蓝外渗含量检测。各给药组 ig 相应药物,对照组和模型组 ig 等体积 0.1%羧甲基纤维素钠溶液,1 次/d,连续 7 d。第 4 天给药 1 h 后,除对照组外,用浸吸 0.16 mL 巴豆油混合液的棉签插入已浅麻醉的大鼠肛门保持 13 s,棉签取出后在肛周均匀涂抹一圈,6 h 后可见大鼠肛周组织充血肿胀并有炎性渗出,即造模成功。于末次给药 1 h,造模 72 h 后进行肛周观察及取材。

2.2 观察及检测指标

2.2.1 肛周形态观察及肛门肿胀抑制率测定 观察、记录各组大鼠肛周红肿、黏液分泌、排便不畅、便血等情况。并于造模前(0 h)、造模后 72 h 分别测量各组大鼠肛门周围组织的长直径和短直径,取

其长短两直径均值的乘积作为肿胀面积,并计算肛门肿胀抑制率。

肛门肿胀抑制率 = $1 - (\text{给药 72 h 肛周面积} - \text{给药 0 h 肛周面积}) / (\text{模型 72 h 肛周面积} - \text{模型 0 h 肛周面积})$

2.2.2 肛门直肠大体观察及肛肠指数测定 末次给药 1 h 后,以 1%戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉采全血于抗凝采血管中,肛周脱毛,棉签置入肛门内作为指引,沿肛周 5 mm 处环形分离肛门,深置直肠 15 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,行肛门直肠大体观察后称定质量,计算肛肠指数,并测量肛门直肠宽度。

肛肠指数 = 肛肠湿质量/体质量

2.2.3 肛门组织病理学观察 取部分肛门直肠组织,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(HE)染色后脱水封片,于显微镜下观察,采集图像分析。

2.2.4 全血白细胞计数及分类 取抗凝采血管中部分全血,于全血细胞计数仪上测定白细胞及分类。

2.2.5 肛门组织及血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、IFN- γ 、NO 含量测定 取 -80 °C 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 °C、10 000 r/min 离心 10 min,取上清为肛门组织待测样品。取抗凝采血管中剩余全血,4 °C、3 000 r/min 离心 10 min,分离得到血清样品, -80 °C 保存备用。取肛门组织上清与血清样品,按照试剂盒说明书检测 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、IFN- γ 、NO 含量。

2.2.6 qRT-PCR 检测肛门组织中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、COX-2、IFN- γ 和 iNOS mRNA 表达 称取肛门组织适量,采用 Trizol 法提取总 RNA,并按试剂盒要求合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

2.2.7 血管通透性检测 采用伊文思蓝法检测肛门及直肠组织血管通透性^[2]。大鼠麻醉后经尾静脉注射 2%伊文思蓝溶液(40 mg/kg),1 h 后移出肛门直肠标本置于 10 mL 离心管中,加入 1 mL 甲酰胺溶液(肛门直肠组织:甲酰胺溶液 = 100 mg/mL),55 °C 水浴孵育 24 h,离心后取上清测定 620 nm 处的吸光度(A)值,以甲酰胺为空白对照,用不同浓度伊文思蓝溶液制作的标准曲线,计算各样本伊文思蓝含量。

2.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异性采用 GraphPad

Prism 5 统计学软件进行 t 检验和单因素方差分析。

3 结果

3.1 消痔丸对巴豆油致肛门肿胀模型大鼠肛门直肠的影响

3.1.1 肛周组织形态观察及肿胀抑制率 对照组大

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
<i>IL-6</i>	F: ACTTCCAGCCAGTTGCCT R: TGGTCTGTTGTGGGTATCCTC
<i>IL-1β</i>	F: AATCTCACAGCAGCATCTCGACAAG R: TCCACGGGCAAGACATAGGTAGC
<i>TNF-α</i>	F: CACCACGCTCTTCTGTCTACTGAAC R: TGGGCTACGGGCTTGCTACTC
<i>COX-2</i>	F: AGTCATCAGCCACAGGAGGAAGG R: CACATTTGATTGACAGCCACCAAC
<i>IFN-γ</i>	F: ACAACCCACAGATCCAGCACAAAG R: CACCGACTCCTTTTCCGCTTC
<i>iNOS</i>	F: ACCACCACACAGCCTCAGAGT R: ACCGGAGGGACCAGCCAAATC
<i>GAPDH</i>	F: CAGCGACACCCACTCCTC R: TGAGGTCCACCACCCTGT

表 2 消痔丸对巴豆油致肛门肿胀模型大鼠肛门肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Xiaozhi Pills on anal swelling of hemorrhoidal rats induced by croton oil preparation ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肛门面积/cm ²		肿胀抑制率/%
		0 h	72 h	
模型	—	0.33 ± 0.06	0.58 ± 0.04 ^{###}	—
柑橘黄酮片	0.27	0.33 ± 0.07	0.45 ± 0.09 ^{**}	50.01 ± 12.72
痔疮消片	0.86	0.34 ± 0.07	0.48 ± 0.07 [*]	44.22 ± 19.88
消痔丸	0.81	0.31 ± 0.07	0.46 ± 0.05 ^{**}	41.14 ± 28.42
	1.62	0.32 ± 0.07	0.44 ± 0.07 ^{***}	53.21 ± 21.70
	3.24	0.34 ± 0.05	0.44 ± 0.04 ^{***}	60.35 ± 16.56

与模型组 0 h 比较: ^{###} $P < 0.01$; 与模型组 72 h 比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$

^{###} $P < 0.01$ vs 0 h model group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs 72 h model group

并明显失去弹性, 直肠横截面周长明显增加 ($P < 0.001$, 表 3), 说明直肠和肛门肌肉功能受损, 肠道运动能力下降且肠壁血液循环受阻。柑橘黄酮片、痔疮消片与不同剂量的消痔丸干预后, 均能使大鼠肛门直肠组织黏膜损伤减轻、水肿程度降低、组织增厚减轻、直肠横截面周长降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。

3.1.3 肛肠指数 肛肠指数可在一定程度反映组织肿胀程度, 越大代表组织炎症肿胀程度越高。如表 4 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠肛肠指数显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 柑橘黄酮片和痔疮消片与不同剂量的消痔丸均可显著降低大鼠肛肠指数 ($P < 0.001$)。

鼠肛门回缩, 无水肿等异常情况。模型组大鼠在造模 2 h 后肛门可见红肿, 且有少量黏液溢出; 5~6 h 后肛门肿胀度明显, 肛门潮湿度增加且黏液溢出增多, 偶见轻度糜烂; 24 h 后大鼠肛门出现粪便异常滞留情况, 偶见出血点; 32 h 后出现轻度排便困难, 48 h 后出现排便严重困难情况, 72 h 仍有粪便异常滞留情况。经柑橘黄酮片、痔疮消片和不同剂量消痔丸给药后可观察到大鼠肛周肿胀程度降低, 黏液分泌、糜烂、便秘及出血等症状均得到明显改善。

通过测量各组大鼠肛门肿胀面积, 计算得到各给药组肿胀抑制率 (表 2), 与造模前 (0 h) 比较, 模型组造模后 72 h 肿胀面积显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组 72 h 比较, 各给药组 72 h 的肿胀面积均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 其中消痔丸中、高剂量组肿胀抑制率分别为 53.21% 和 60.35%。

3.1.2 肛门直肠大体观察 对照组大鼠直肠肛管形态正常, 未发现黏膜出血、水肿和溃疡; 模型组大鼠直肠肛管出血水肿、颜色变浅, 粪便积结滞留于结肠和直肠、结肠膨胀变形明显、直肠增生性肥厚,

表 3 消痔丸对巴豆油致肛门肿胀模型大鼠直肠肛管的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Xiaozhi Pills on anorectal width of hemorrhoidal rats induced by croton oil preparation ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	直肠横截面周长/cm
对照	—	1.02 ± 0.08
模型	—	1.41 ± 0.30 ^{###}
柑橘黄酮片	0.27	1.19 ± 0.14 [*]
痔疮消片	0.86	1.17 ± 0.08 ^{**}
消痔丸	0.81	1.17 ± 0.11 ^{**}
	1.62	1.06 ± 0.07 ^{***}
	3.24	1.18 ± 0.12 [*]

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

^{*} $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.010$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$

^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group, same as below tables

表 4 消痔丸对巴豆油致肛门肿胀模型大鼠肛肠指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Effect of Xiaozhi Pills on anorectal index of hemorrhoidal rats induced by croton oil preparation ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肛肠指数
对照	—	0.105 ± 0.007
模型	—	0.188 ± 0.029 ^{###}
柑橘黄酮片	0.27	0.143 ± 0.010 ^{***}
痔炎消片	0.86	0.138 ± 0.012 ^{***}
消痔丸	0.81	0.141 ± 0.010 ^{***}
	1.62	0.131 ± 0.005 ^{***}
	3.24	0.121 ± 0.011 ^{***}

3.2 消痔丸对巴豆油致肛门肿胀模型大鼠血管通透性的影响

局部毛细血管通透性增高可引起大分子血浆蛋白外渗形成组织水肿, 一般采用伊文思蓝定量检测将血管通透性准确量化。如表 5 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠直肠肛管的伊文思蓝含量显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 柑橘黄酮片、痔炎消片及不同剂量消痔丸组可显著降低大鼠直肠肛管的伊文思蓝含量 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

3.3 消痔丸对巴豆油致肛门肿胀模型大鼠肛门直肠组织病理的影响

如图 1 所示, 对照组大鼠肛门直肠组织结构正

表 5 消痔丸对巴豆油诱导肛门肿胀模型大鼠血管通透性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 5 Effect of Xiaozhi Pills on vascular permeability of hemorrhoidal rats induced by croton oil preparation ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	伊文思蓝/($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)
对照	—	43.24 ± 10.04
模型	—	115.62 ± 24.68 ^{###}
柑橘黄酮片	0.27	72.48 ± 17.50 ^{**}
痔炎消片	0.86	89.85 ± 25.72 [*]
消痔丸	0.81	62.45 ± 20.58 ^{***}
	1.62	55.65 ± 23.21 ^{***}
	3.24	54.95 ± 29.18 ^{***}

常, 腺上皮、鳞状上皮、黏膜层、黏膜下层、肌层黏膜和肌层完整。模型组大鼠肛门直肠组织黏膜上皮层坏死、丢失, 鳞状上皮、腺上皮、黏膜层和黏膜下层出现充血、水肿, 黏膜下层及肌层上层可见大量粒细胞、浆细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润, 炎症区黏膜增厚, 并伴有血管扩张。不同剂量的消痔丸可明显改善黏膜下层、肌层水肿、出血, 黏膜增厚也明显改善, 并可抑制炎性细胞浸润至肌层上层, 消痔丸低剂量组鳞状上皮坏死并未得到改善, 但消痔丸中高剂量组可改善鳞状上皮坏死、丢失, 提示消痔丸对急性炎症反应具有治疗作用。

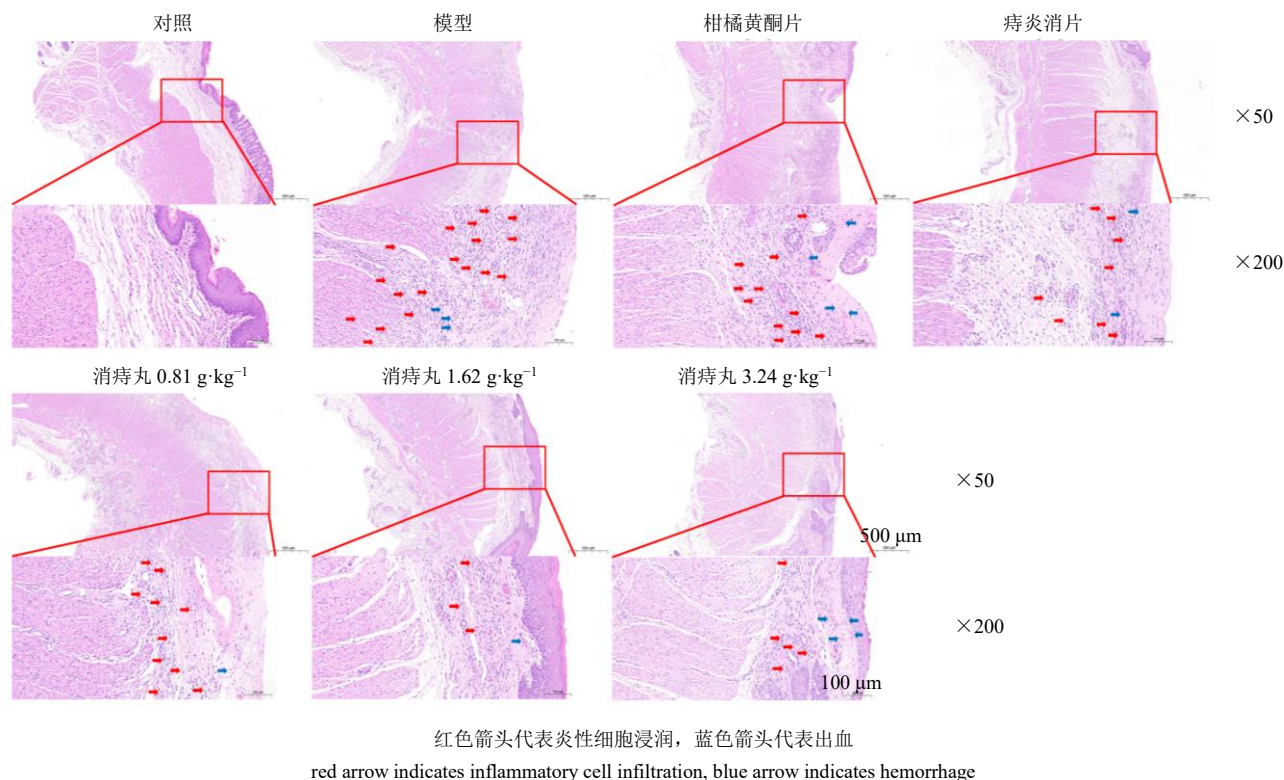


图 1 消痔丸对巴豆油诱导肛门肿胀模型大鼠肛门直肠组织病理的影响 (HE)

Fig. 1 Effect of Xiaozhi Pills on anorectal tissue pathology of hemorrhoidal rats induced by croton oil preparation (HE)

3.4 消痔丸对巴豆油致肛门肿胀模型大鼠全血白细胞计数及分类的影响

如表 6 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠外周血白细胞数量升高 ($P<0.001$), 中性粒细胞和单核细胞比例显著增加 ($P<0.001$), 淋巴细胞比例显著降低 ($P<0.01$), 推测为大鼠肛管经巴豆油涂抹后诱导炎症反应, 刺激白细胞募集于肛管直肠部位。与模型组比较, 柑橘黄酮片与痔炎消片可显著降低全血中白细胞数量 ($P<0.05$), 降低中性粒细胞与单核细胞比例 ($P<0.05$ 、 0.01)。不同剂量的消痔丸可显著降低全血中白细胞数量 ($P<0.001$), 降低中性粒细胞与单核细胞比例 ($P<0.01$ 、 0.001), 消痔丸中剂量组显著增加淋巴细胞比例 ($P<0.05$)。

3.5 消痔丸对巴豆油致肛门肿胀模型大鼠血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、IFN- γ 、NO 水平的影响

如表 7 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、IFN- γ 、NO 水平均显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, 柑橘黄酮片可显著降低 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和 PGE₂ 水平 ($P<0.05$), 痔炎消片可显著降低 IL-6、TNF- α 水平 ($P<0.05$); 不同剂量的消痔丸可显著降低血清中 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、IFN- γ 和 NO 水平 ($P<0.05$ 、

0.01), 中、高剂量的消痔丸可显著降低血清中 IL-6 水平 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.6 消痔丸对巴豆油致肛门肿胀模型大鼠肛门直肠组织中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、IFN- γ 、NO 水平的影响

如表 8 所示, 与对照组比较, 模型组肛门直肠组织中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、IFN- γ 、NO 水平均显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, 柑橘黄酮片与痔炎消片可显著降低肛门直肠组织中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、IFN- γ 、NO 水平 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 不同剂量的消痔丸可显著降低肛门直肠组织中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、NO 水平 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 中、高剂量的消痔丸可显著降低肛门直肠组织中 IFN- γ 水平 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.7 消痔丸对巴豆油致肛门肿胀模型大鼠肛门组织中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、COX-2、IFN- γ 、iNOS mRNA 表达的影响

前期研究发现, 巴豆油涂抹肛管及肛周后可诱导炎症反应, 表现在 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂ 等炎症因子水平显著升高, 因此, 对相关炎症因子基因水平的表达进行考察。如表 9 所示, 与对照组比较, 模型组 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、COX-2、IFN- γ 、

表 6 消痔丸对巴豆油诱导肛门肿胀模型大鼠全血白细胞计数及分类的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 6 Effect of Xiaozhi Pills on leukocyte count and its classification of blood in hemorrhoidal rats induced by croton oil preparation ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	白细胞/(1×10 ⁹ 个·L ⁻¹)	中性粒细胞/%	单核细胞/%	淋巴细胞/%
对照	—	5.19±0.81	16.73±1.97	2.19±0.33	80.95±2.07
模型	—	9.22±1.82 ^{###}	23.95±1.71 ^{###}	2.89±0.29 ^{###}	76.74±1.63 ^{##}
柑橘黄酮片	0.27	7.55±1.30 [*]	21.65±2.40 [*]	2.57±0.26 [*]	75.72±2.62
痔炎消片	0.86	7.60±0.86 [*]	20.17±2.37 ^{**}	2.52±0.27 ^{**}	77.17±2.60
消痔丸	0.81	6.71±0.80 ^{***}	19.09±2.29 ^{***}	2.49±0.25 ^{**}	77.69±3.30
	1.62	5.39±0.90 ^{***}	17.73±2.38 ^{***}	2.46±0.37 ^{**}	79.18±3.27 [*]
	3.24	5.51±1.29 ^{***}	18.45±2.31 ^{***}	2.38±0.36 ^{**}	78.75±3.08

表 7 消痔丸对巴豆油诱导肛门肿胀模型大鼠血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、IFN- γ 、NO 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 7 Effect of Xiaozhi Pills on levels of IL-6, IL-1 β , TNF- α , PGE₂, IFN- γ and NO in serum of hemorrhoidal rats induced by croton oil preparation ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-6/(ng·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	PGE ₂ /(pg·mL ⁻¹)	IFN- γ /(pg·mL ⁻¹)	NO/(μ mol·L ⁻¹)
对照	—	0.45±0.04	12.69±3.65	4.19±1.91	74.63±8.34	0.11±0.01	3.20±0.78
模型	—	0.56±0.05 ^{##}	167.56±34.42 ^{##}	220.40±154.20 ^{##}	161.99±53.68 ^{##}	0.22±0.12 [#]	14.94±6.84 ^{##}
柑橘黄酮片	0.27	0.48±0.07 [*]	120.65±25.58 [*]	27.24±18.96 [*]	88.70±41.17 [*]	0.15±0.06	7.13±9.07
痔炎消片	0.86	0.46±0.07 [*]	130.58±33.53	40.75±15.88 [*]	112.50±44.25	0.13±0.02	7.41±5.66
消痔丸	0.81	0.47±0.11	129.82±9.44 [*]	26.19±21.12 [*]	68.54±34.48 ^{**}	0.10±0.04 [*]	6.71±3.78 [*]
	1.62	0.45±0.08 [*]	119.25±31.94 [*]	26.78±30.52 [*]	23.72±5.12 ^{**}	0.07±0.04 [*]	4.87±1.63 ^{**}
	3.24	0.43±0.06 ^{**}	124.41±26.08 [*]	27.50±17.46 [*]	20.84±21.73 ^{**}	0.11±0.03 [*]	5.95±3.47 [*]

表 8 消痔丸对巴豆油诱导肛门肿胀模型大鼠肛管直肠组织中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、IFN- γ 、NO 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 8 Effect of Xiaozhi Pills on levels of IL-6, IL-1 β , TNF- α , PGE₂, IFN- γ and NO in anorectal tissue of hemorrhoidal rats induced by croton oil preparation ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	IL-6/(ng·mg ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mg ⁻¹)	TNF- α /(pg·mg ⁻¹)	PGE ₂ / (ng·mg ⁻¹)	IFN- γ /(ng·mg ⁻¹)	NO/(pmol·mg ⁻¹)
对照	—	58.33 ± 12.66	38.59 ± 5.08	33.78 ± 6.13	0.12 ± 0.04	0.26 ± 0.05	0.37 ± 0.08
模型	—	94.57 ± 22.51 ^{###}	81.24 ± 15.96 ^{###}	59.53 ± 15.80 ^{###}	0.68 ± 0.25 ^{###}	0.37 ± 0.05 ^{##}	0.80 ± 0.24 ^{###}
柑橘黄酮片	0.27	35.17 ± 11.44 ^{***}	50.67 ± 13.93 ^{***}	27.21 ± 5.73 ^{***}	0.45 ± 0.25 [*]	0.26 ± 0.05 ^{**}	0.44 ± 0.14 ^{***}
痔疮消片	0.86	41.47 ± 17.09 ^{***}	55.59 ± 15.80 ^{***}	33.08 ± 10.29 ^{***}	0.46 ± 0.20 [*]	0.26 ± 0.05 ^{**}	0.53 ± 0.24 [*]
消痔丸	0.81	41.36 ± 17.76 ^{***}	47.81 ± 10.38 ^{***}	32.80 ± 12.01 ^{***}	0.44 ± 0.25 [*]	0.32 ± 0.07	0.56 ± 0.24 [*]
	1.62	38.72 ± 15.21 ^{***}	43.05 ± 5.01 ^{***}	32.30 ± 5.88 ^{***}	0.34 ± 0.24 ^{***}	0.29 ± 0.06 [*]	0.53 ± 0.16 ^{**}
	3.24	44.60 ± 16.24 ^{***}	44.98 ± 11.38 ^{***}	35.40 ± 7.70 ^{***}	0.30 ± 0.21 ^{***}	0.27 ± 0.07 ^{**}	0.56 ± 0.13 [*]

表 9 消痔丸对巴豆油诱导肛门肿胀模型大鼠肛管直肠组织中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、COX-2、IFN- γ 、iNOS mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 9 Effect of Xiaozhi Pills on IL-6, IL-1 β , TNF- α , COX-2, IFN- γ and iNOS mRNA expressions in anorectal tissue of hemorrhoidal rats induced by croton oil preparation ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量					
		IL-6	IL-1 β	TNF- α	COX-2	IFN- γ	iNOS
对照	—	1.01 ± 0.20	1.14 ± 0.67	1.01 ± 0.19	1.03 ± 0.29	1.09 ± 0.57	1.02 ± 0.25
模型	—	1.86 ± 0.34 ^{##}	4.25 ± 1.38 ^{###}	1.92 ± 0.65 [#]	2.89 ± 0.72 ^{##}	3.39 ± 0.61 ^{###}	2.43 ± 0.18 ^{##}
柑橘黄酮片	0.27	1.08 ± 0.18 ^{**}	1.75 ± 0.20 ^{**}	0.73 ± 0.34 ^{**}	1.69 ± 0.59	1.04 ± 0.11 ^{***}	1.42 ± 0.05 [*]
痔疮消片	0.86	1.06 ± 0.14 ^{**}	1.69 ± 0.32 ^{**}	0.72 ± 0.20 ^{**}	2.15 ± 0.70	1.91 ± 0.64 ^{**}	1.42 ± 0.41 ^{**}
消痔丸	0.81	1.31 ± 0.31	1.89 ± 0.55 ^{**}	0.82 ± 0.13 ^{**}	1.26 ± 0.17 [*]	1.23 ± 0.32 ^{***}	1.63 ± 0.67
	1.62	1.02 ± 0.07 ^{**}	1.80 ± 0.62 ^{**}	0.63 ± 0.26 ^{**}	1.34 ± 0.21 [*]	1.21 ± 0.37 ^{***}	0.88 ± 0.36 ^{**}
	3.24	0.97 ± 0.27 ^{**}	1.27 ± 0.32 ^{***}	0.70 ± 0.10 ^{**}	1.09 ± 0.32 ^{**}	1.14 ± 0.29 ^{***}	0.90 ± 0.26 ^{**}

iNOS mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001); 而经不同给药组处理后, 各炎症因子基因表达水平均有不同程度的下降, 柑橘黄酮片和痔疮消片可显著降低肛管直肠组织中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 、iNOS mRNA 表达水平 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 不同剂量的消痔丸均可显著降低 IL-1 β 、TNF- α 、COX-2、IFN- γ mRNA 表达水平 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 中、高剂量的消痔丸可显著降低 IL-6、iNOS mRNA 表达水平 ($P < 0.01$)。

4 讨论

痔疮最早可见于《黄帝内经》之《素问·生气通天论》, 言: “因而饱食, 筋脉横解, 肠澼为痔”, 指出了痔的病因病机为饮食不节、筋脉血肉瘀滞松弛和肠澼。现代医学对痔疮的发病机制主要有肛垫下移学说、静脉曲张学说等。肛垫下移学说认为, 在腹压升高等原因下肛垫内的结缔组织和黏膜下肌遭到破坏而松弛、断裂, 肛垫失去支持而下移, 脱出肛门而为痔疮^[3]。静脉曲张学说认为, 痔疮形成与痔静脉丛淤血、扩张和屈曲相关。由于门静脉系统

无静脉瓣, 人长期处于直立的体位导致了痔静脉压力升高, 各种原因引起的腹内压升高、门脉高压可导致痔静脉曲张^[4]。痔疮作为最常见的肛肠疾病之一, 日渐呈现全年龄段发病趋势^[5]。痔疮临床症状表现为排便困难、肛周肿胀、疼痛出血等^[6]。

痔病是人类特有疾病, 痔病动物模型以模拟其病理学特征为目的^[7]。目前痔疮动物模型造模方法较多, 如化学试剂(巴豆油、醋酸等)诱导, 细菌诱导, 肛门周围皮肤创伤, 静脉曲张等, 其中最常用也较为成熟的仍是化学试剂局部刺激方法^[1]。研究发现巴豆油可刺激肛管直肠组织内小胶质细胞释放 IL-6、TNF- α 等炎症因子, 并增加 iNOS 表达, 合成并释放更多的 NO, 加速痛觉敏化, 导致大鼠肛门肿胀, 较为吻合临床上痔病患者的病理诊断^[8-9], 因此本研究采用巴豆油混合液作用于大鼠肛管直肠黏膜, 成功构建了大鼠急性痔病, 表现为肛周肿胀、黏液溢出等肛肠宏观症状, 此外伊文思蓝含量显著增加提示巴豆油可引起直肠毛细血管严重扩张, 同时组织病理的观察进一步证实了这一点。而消痔丸

可显著改善巴豆油所致大鼠肛周宏观症状,降低肛肠指数和直肠伊文思蓝含量,抑制肛门直肠组织鳞状上皮细胞的缺失、炎性细胞浸润、充血等,初步表明消痔丸能减轻巴豆油引起的严重水肿、出血及炎症,改善急性痔病的整体进展。

痔病发展的确切病理生理学仍未确定,但可能与肛垫的机械损伤、静脉瘀血、痔神经丛或肛肠区域的血管异常以及组织炎症有关,在脱垂或血栓形成的病变中,炎症反应尤其明显,因此,炎症可能在痔病的发病或急性痔疮症状的加重中发挥作用^[10]。据报道,痔组织中 TNF- α 、IL-6、COX-2、iNOS 等因子的表达高于正常肛垫组织^[11],从而引起局部 T 细胞异常堆积,引起局部炎症因子分泌和功能失控^[12]。现代药理学研究表明,牡丹皮中丹皮酚是发挥抗炎作用的主要成分,对由角叉菜、蛋清等致炎剂致大鼠足肿胀、二甲苯性小鼠耳廓肿胀和内毒素所致腹腔毛细血管通透性升高等均有明显抑制作用,可抑制大鼠白细胞炎性趋向性和 PGE₂ 合成,并显示出明显的外周及中枢镇痛作用^[13]。酒大黄可更有效降低肺炎大鼠血白细胞数与 TNF- α 水平,减少肺泡炎性渗出,抗菌消炎作用增强^[14]。槐角黄酮可显著抑制二甲苯所致小鼠耳廓肿胀以及小鼠滤纸肉芽肿、角叉菜胶引起的大鼠足肿胀,并降低腹腔毛细血管通透性,还可下调脂多糖刺激的 RAW264.7 巨噬细胞中 IL-6 水平,抑制 NO 和 PGE₂ 释放,表现出良好的抗炎活性^[15]。同时方中白及收敛止血、消肿生肌;防己祛风止痛、利水消肿;白术健脾益气、燥湿利水,为发挥消肿作用的主要物质基础。研究表明,白及多糖能刺激人脐静脉内皮细胞的增殖和血管内皮生长因子的表达,还可刺激巨噬细胞 iNOS、TNF- α 和 IL-1 β 的表达,从而促进伤口愈合,发挥消肿生肌作用^[16]。防己黄芪汤能降低水通道蛋白 2 含量,减少液体积聚于组织间隙或体腔内,从而发挥利水作用^[17]。白术多糖一方面可通过非 Toll 样受体 4 依赖性丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和核因子- κ B 信号通路诱导脾细胞激活,促进 NO、免疫球蛋白 G 和细胞因子的分泌,另一方面可显著提高 IEC-6 细胞中多胺含量、胞质中 Ca²⁺ 水平,激活多胺-kv1.1 信号通路,促进肠上皮细胞的迁移,促进肠损伤的愈合^[18],从而发挥健脾燥湿利水作用。本研究表明消痔丸可显著降低血液中白细胞数量及中性粒细胞、单核细胞比例,显著降低血清及肛门直

肠组织中致炎及致痛因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂、IFN- γ 、NO 的含量,抑制肛门直肠组织中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、COX-2、IFN- γ 、iNOS mRNA 的表达水平。

综上,消痔丸可明显改善巴豆油诱导的肛门直肠组织损伤,主要通过抑制 IL-6、TNF- α 、PGE₂ 等相关炎症及致痛细胞因子和调节其相应的靶基因发挥治疗痔病肿痛、炎症和便秘出血等作用,并且本研究发现消痔丸中剂量(相当于临床剂量)对急性痔病的改善具有剂量优势,为临床应用奠定一定的药理研究基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 周俊,吕小会,党丽云,等.建立一种新型痔疮动物模型的方法研究[J].中国现代应用药学,2019,36(5):526-531.
- [2] 黄丹丹,刘智敏,赵严冬,等.芍倍注射液对痔急性发作模型大鼠直肠肛管组织病理形态学、炎症反应的影响研究[J].结直肠肛门外科,2020,26(4):451-455.
- [3] 郑建华.郑氏痔科验方治疗痔疮用药特点研究[D].广州:广州中医药大学,2018.
- [4] 曹茜茜.瑶医挑针疗法治疗痔疮的临床研究[D].南宁:广西中医药大学,2020.
- [5] 陈礼平.痔疮中西医结合治疗进展[J].光明中医,2018,33(6):904-906.
- [6] 王月.疼痛护理对痔疮患者术后生活质量的影响[J].中国卫生标准管理,2021,12(18):130-132.
- [7] 张琛伟,许琼明,高红伟,等.白头翁皂苷 B₄ 栓剂治疗大鼠痔疮的药效学研究[J].药物评价研究,2022,45(5):853-863.
- [8] 苗明三,常兵杰,白明,等.急性咽炎动物模型制备规范(草案)起草说明[J].中药药理与临床,2018,34(1):176-178.
- [9] 孙松朋,张媛,赵宝明.应用巴豆油制作 SD 大鼠肛门水肿模型的实验验证研究[J].中国煤炭工业医学杂志,2016,19(3):392-393.
- [10] Godeberge P, Sheikh P, Lohsiriwat V, et al. Micronized purified flavonoid fraction in the treatment of hemorrhoidal disease[J]. J Comp Eff Res, 2021, 10(10):801-813.
- [11] Lohsiriwat V. Hemorrhoids: From basic pathophysiology to clinical management[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(17):2009-2017.

- [12] 孙松朋. 基于组织出血和慢性炎症反应对痔病病理机制的探讨 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [13] 张树蓉, 赵宏苏, 佟沫儒, 等. 牡丹皮化学成分、药理作用及其质量标志物 (Q-Marker) 的预测分析 [J]. 中草药, 2022, 53(16): 5215-5224.
- [14] 韩思琪, 哈伟, 师彦平. 大黄及其有效成分抗炎作用的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(1): 303-316.
- [15] 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, 11: 206-212.
- [16] Hung H Y, Wu T S. Recent progress on the traditional Chinese medicines that regulate the blood [J]. *J Food Drug Anal*, 2016, 24(2): 221-238.
- [17] 乔铁, 马进, 刘丽, 等. 防己黄芪汤对阿霉素肾病大鼠蛋白尿及水通道蛋白 2 的影响 [J]. 中医药信息, 2015(4): 17-19.
- [18] Luo L, Cai J, Zhou Z, *et al*. Polysaccharides from *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae*: A review on their extraction, purification, structure, and bioactivities [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 2338533.

[责任编辑 李亚楠]