

参柏温敏凝胶的制备及其对痔疮模型大鼠的药效作用

管咏梅^{1,3}, 张煜薇¹, 陶颖¹, 郝凌峰¹, 陈丽梅^{1,2*}, 李哲¹, 朱卫丰¹, 臧振中¹

1. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004
2. 江西中医药大学附属医院, 江西 南昌 330004
3. 经典名方现代中药创制全国重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 制备参柏(苦参 *Sophorae Flavescentis Radix*-黄柏 *Phellodendri Chinensis Cortex*)温敏凝胶(Shenbo thermosensitive gel, SBTG), 对其进行质量评价并探究其对痔疮大鼠模型的药效作用。方法 以泊洛沙姆 407 (Poloxamer 407, P407)、泊洛沙姆 188 (Poloxamer 188, P188) 为凝胶基质, 以胶凝温度作为评价指标, 采用 Box-Beheken 设计-响应面法(Box-Beheken design-response surface method, BBD-RSM) 确定 SBTG 最优处方, 并对其外观性状、微观形态、流变学特性、体外释药等进行评价。构建痔疮模型大鼠, 以血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 及肛周肿胀度、直肠系数等为指标, 考察 SBTG 治疗痔疮模型大鼠的药效。采用荧光定量 PCR 法、蛋白质印迹法(Western Blotting) 检测直肠组织中缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP9)、组织金属蛋白酶抑制因子-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1) 的表达, 探索其作用机制。结果 SBTG 处方为 P407 用量 15%, P188 用量 2.5%、聚山梨酯-80 用量 1.8%、1,2-丙二醇用量 15%、参柏提取物用量 5%; SBTG 胶凝温度为 33 °C, 室温下为棕黄色较为黏稠且具有流动性的液体, 33 °C 及以上即转为棕黄色凝胶状半固体, 微观形态为稳定的三维网状结构。体外释放结果表明, SBTG 中指标成分(氧化苦参碱、苦参碱、小檗碱) 释放时间较参柏提取物溶液长、具有缓释作用, 符合一级动力学方程。药效学研究表明, 与空白组相比, 模型组大鼠肛门潮湿度增加且黏液溢出增多, 偶见轻度糜烂, 排泄物积滞带血; 与模型组相比, 阳性药(马应龙痔疮膏) 组和 SBTG 组大鼠肛周肿胀程度明显降低, 黏液分泌、糜烂、便秘及出血等症状得到明显改善; 可抑制炎症细胞浸润, 血清中炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.001$)。SBTG 可抑制 HIF-1 α 、VEGF、MMP9 表达, 提高 TIMP-1 表达。结论 SBTG 处方及制备工艺简单、可行性高, 具有良好的缓释性能, 且对痔疮模型大鼠表现出良好的治疗作用, 可改善炎症反应及肛门直肠组织病理学损伤。

关键词: 温敏凝胶; 苦参; 黄柏; 药效学; 痔疮; Box-Beheken 设计-响应面法; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-6; 荧光定量 PCR 法; 蛋白质印迹法; 缺氧诱导因子-1 α ; 血管内皮生长因子; 基质金属蛋白酶-9; 组织金属蛋白酶抑制因子-1; 氧化苦参碱; 苦参碱; 小檗碱

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)23-7999-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.23.008

Preparation of Shenbo thermosensitive gel and its pharmacodynamic effect on hemorrhoid model rats

GUAN Yongmei^{1,3}, ZHANG Yuwei¹, TAO Ying¹, HAO Lingfeng¹, CHEN Limei^{1,2}, LI Zhe¹, ZHU Weifeng¹, ZANG Zhenzhong¹

1. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China
2. The Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China
3. State Key Laboratory for the Modernization of Classical and Famous Prescriptions of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

收稿日期: 2024-05-21

基金项目: 江西省重点研发计划(20224BBG71023); 江西省中医药标准化技术委员会标准化项目(2024A010); 江西中医药大学 2023 年“大学生创新创业训练计划”项目(X202310412176); 2023 年度江西中医药大学校级研究生创新专项(JZYC23S68); 医院定向委托项目(2004-5252200403)

作者简介: 管咏梅, 教授, 博士生导师, 从事中药新制剂与新技术研究。E-mail: guanym2008@163.com

***通信作者:** 陈丽梅, 博士, 硕士生导师, 从事中药药理学研究。E-mail: 416325174@qq.com

Abstract: Objective Shenbo [*Sophorae Flavescentis Radix*, SFR]-Huangbo [*Phellodendri Chinensis Cortex*, PCC)] thermosensitive gel (SBTG, 参柏温敏凝胶) was prepared to evaluate its quality and investigate its efficacy in a rat model of hemorrhoids. **Methods** Poloxamer 407 (P407) and Poloxamer 188 (P188) were used as gel matrices, and the gelation temperature was used as the evaluation index, and the Box-Beheken design-response surface method (BBD-RSM) to determine the optimal prescription of SBTG and evaluate its appearance properties, micromorphology, rheological properties and *in vitro* drug release. A hemorrhoid model rat was constructed, and the efficacy of SBTG in treating hemorrhoid model rats was investigated by using serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-1 β , and the degree of perianal swelling and rectal coefficient as indicators. Fluorescence quantitative PCR and protein blotting (Western Blotting) were employed to detect hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase-9 (MMP9), and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) to explore their mechanisms of action. **Results** The prescription of SBTG was 15% P407, 2.5% P188, 1.8% polysorbate-80, 15% 1,2-propanediol, and 5% ginseng cypress extract; the gelation temperature of SBTG was 33 °C, and it was a brownish-yellow viscous liquid with mobility at room temperature, and it transformed into a brownish-yellow gelatinous semi-solid at 33 °C or higher, and the microscopic morphology was the stable 3D reticulation structure. The microstructure is a stable three-dimensional mesh structure. The *in vitro* release results showed that the release time of the index components of SBTG (oxymatrine, matrine, berberine) was longer than that of the solution of SFR-PCC extract, and it had a delayed-release effect, which was in accordance with the first-degree kinetic equation. Pharmacodynamic studies showed that, compared with the blank group, the model group of rats increased anal wetness and mucus overflow, occasional mild erosion, excreta stagnation with blood; compared with the model group, the positive drug (Ma Yinglong Hemorrhoidal Ointment) group and the SBTG group of rats perianal swelling was significantly reduced, and symptoms such as mucus secretion, erosion, constipation and bleeding were significantly improved; it could inhibit inflammatory cell infiltration, and the serum inflammatory factors, TNF- α , IL-6 and IL-1 β were significantly reduced ($P < 0.001$). SBTG could inhibit the expression of HIF-1 α , VEGF and MMP9, and increase the expression of TIMP-1. **Conclusion** SBTG prescription and preparation process is simple and feasible, has good slow-release performance, and shows good therapeutic effect on hemorrhoid model rats, which can improve the inflammatory response and anorectal histopathological damage.

Key words: thermosensitive gel; *Sophorae Flavescentis Radix*; *Phellodendri Chinensis Cortex*; pharmacodynamic; hemorrhoids; Box-Beheken design-response surface method; tumor necrosis factor- α ; interleukin-6; fluorescence quantitative PCR; Western Blotting; hypoxia-inducible factor-1 α ; vascular endothelial growth factor; matrix metalloproteinase-9; tissue inhibitor of metalloproteinase-1; oxymatrine; matrine; berberine

痔疮是常见的肛肠疾病之一，占肛肠疾病发生率 80.6%，临床表现为局部炎症、肿痛、便血、痔核脱出等症状，大大影响患者的生活质量^[1]。现代医学研究表明，痔疮的形成可能是由于新生血管形成、炎症因子过度表达、结缔组织的恶化、胶原含量减少和胶原比例改变、血管扩张和血栓形成等^[2-4]。

数据挖掘研究发现，治疗肛肠疾病时，苦参与黄柏配伍使用频次较高^[5-6]，该配伍也见于《外科正宗》卷四中记载“诸疮一扫光”，方由“苦参、黄柏、烟胶、木鳖子、蛇床子……”组成，主治干湿痒疮。《本草纲目》记载“苦参、黄柏之苦寒……盖取其苦燥湿，寒除热也。热生风，湿生虫，故又能治风杀虫……”^[7]。苦参清热燥湿、杀虫止痒，为治疗下焦湿热之症常用药物^[8]。黄柏苦寒沉降，善清泄下焦湿热并有解毒疗疮之效。二者配伍相须而用，共奏清热燥湿、解疮生肌之效。二者在临床中也表现出良好的应用前景，以苦参-黄柏为君药（比例为 1：

1）的院内制剂“痛痒消洗剂”^[9]、“二黄苦参汤”^[10]皆对治疗肛肠疾病术后患者具有良好的临床疗效。苦参、黄柏中含有多种活性成分，如苦参碱、氧化苦参碱、小檗碱、黄柏碱等，具有抗炎^[11]、镇痛^[12]、抑菌^[13]、抑制血管新生^[14]等多种功效，研究证实，苦参-黄柏药对具有治疗肛肠疾病的潜在作用^[5-6,15]。

温敏凝胶是一类可对环境温度响应产生相变的半固体凝胶制剂，在室温下为溶液状态，待温度到达胶凝温度后，即转变为半固体凝胶状态^[16]，具有良好的生物相容性^[17]、较强的直肠黏附力及缓释作用^[16]。因此，本研究采用温敏凝胶包载苦参-黄柏提取物，以泊洛沙姆 407 (P407)、泊洛沙姆 188 (P188) 为主要凝胶基质，探究参柏温敏凝胶 (Shenbo thermosensitive gel, SBTG) 处方，并进行质量评价，同时以巴豆油诱导剂诱导构建大鼠痔疮模型，通过观察 SBTG 给药后肛门直肠区病理学变化以及炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF-

α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 分泌情况,进一步考察 SBTG 在痔疮中的药效作用及其机制。

1 仪器与材料

1.1 仪器

ZNCL-BS 140*140 型磁力搅拌器购自西安安泰仪器科技有限公司;C-15R 型台式高速冷冻离心机购自德国 NACHT 公司;MCR101 型流变仪购自奥地利 Anton Paar Physica 公司;SPARK 型酶标仪购自帝肯奥地利有限责任公司;RM2016 型病理切片机购自德国 LEICA 公司;Agilent 1260 Infinit II 型高效液相色谱仪购自美国安捷伦科技有限公司;TC-EA 型普通 PCR 扩增仪购自杭州博日科技有限公司;CFX Connect™实时型荧光 PCR 仪购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司;ECLIPSE-Ci 型光学显微镜购自日本 NIKON 公司;Quanta 250 型扫描电子显微镜(SEM)购自美国 FEI 公司;SCIENTZ-10N 型冷冻干燥机购自宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 药物和试剂

苦参(产地山西,批号 220221)、黄柏(产地四川,批号 220818)购自江西江中中药饮片有限公司,经江西中医药大学邓可众教授鉴定,分别为豆科槐属植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根、芸香科黄檗属植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮;对照品苦参碱(批号 110805-202010)、氧化苦参碱(批号 110708-201909)、盐酸小檗碱(批号 110713-202015),质量分数均>98%,购自中国食品药品检定研究所;马应龙痔疮膏(批号 221142)购自马应龙药业集团有限公司;P407(批号 GNG06521B)、P188(批号 GNG21822B)购自德国 BASF 公司;巴豆油(批号 C15210701)购自上海麦克林生化科技股份有限公司;聚山梨酯-80(批号 T104866)购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;吡啶(批号 RH501196)购自上海易恩化学技术有限公司;乙醚(批号 2022101001)购自成都市科隆化学品有限公司;HE 染色套装(批号 S191003)购自皮诺飞生物科技有限公司;大鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 高敏 ELISA 试剂盒(批号 A382H30342);大鼠白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6) 高敏 ELISA 试剂盒(批号 A306H31042);大鼠 IL-1 β 高敏 ELISA 试剂盒(批号 A301BH31016)购自杭州联科生物技术股份有限公司;超纯 RNA 提取试剂盒(批号 ER501)、缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-

inducible factor-1 α , HIF-1 α , 批号 ab179483)购自艾博抗(上海)贸易有限公司;组织金属蛋白酶抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP1, 批号 A1389)购自武汉爱博泰克生物技术有限公司;血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF, 批号 19003-1-AP)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP9, 批号 10375-2-AP)、 β -肌动蛋白(β -actin, 批号 66009-1-Ig)购自武汉三鹰生物技术有限公司;三乙胺(批号 2302112),分析纯,购自西陇科学股份有限公司;乙腈,色谱纯,购自美国 Tedia 公司。

1.3 动物

SPF 级 SD 大鼠,雄性,180~200 g,6~8 周龄,由北京斯贝福生物技术有限公司提供,动物合格证编号:SCXK(京)2019-0010。动物适应性饲养于室温(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(50 ± 5)%。本动物实验经江西中医药大学的伦理委员会批准,伦理审批号 JZLLSC20240505。

2 方法和结果

2.1 SBTG 的制备及胶凝温度的测定

2.1.1 参柏提取物的制备 经课题组前期考察^[15],确定苦参-黄柏药对最佳提取工艺,即称取苦参 60 g、黄柏 60 g 置于圆底烧瓶中,加入 12 倍量 58%乙醇溶液,回流提取 2 次,每次 120 min,合并提取液,减压浓缩干燥,得提取物粉末,提取物得率为 25.03%,即得苦参-黄柏提取物 30.04 g(一处方量)。

2.1.2 SBTG 的制备 称取适量 1,2-丙二醇、聚山梨酯-80、参柏提取物于水中混合均匀,在冰浴条件下加入 P407、P188,搅拌均匀后,密封于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中溶胀过夜,即得 SBTG。采用相同方法制备不添加参柏提取物的空白温敏凝胶(blank thermosensitive gel, BTG)。

2.1.3 胶凝温度的测定 使用“离心管倒置法”测定凝胶的胶凝温度。在离心管加入待测凝胶,置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中(升温速率为 0.2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$),水溶液面需高于离心管内温敏凝胶液面,保证管内受热均匀,每 15 s 拿出离心管反转倒置,观察胶凝情况,待凝胶已达到胶凝温度时,立刻使用温度计测定凝胶内部温度。因人体生理温度为 37 $^{\circ}\text{C}$,将胶凝温度设为低于人体生理温度的 33 $^{\circ}\text{C}$ ^[18],可使温敏凝胶在人体内迅速胶凝。

2.2 单因素考察 BTG 处方

采用单因素实验初步考察 P407、P188、聚山梨

酯-80 用量对 BTG 胶凝温度的影响。

2.2.1 P407 用量考察 固定 P188、聚山梨酯-80 的质量分数为 1%，1,2-丙二醇质量分数为 15%，在冰浴下加入质量分数为 14%、15%、16%、17%、18% 的 P407，搅拌均匀后，于 4℃ 冰箱中溶胀过夜，制备 BGT，测定其胶凝温度。结果 P407 用量为 14%、15%、16%、17%、18% 时，BTG 的胶凝温度分别为 37.9、29.5、28.2、25.1、24.8℃。结果显示，随着 P407 用量的逐渐增大，胶凝温度逐渐降低，因此选择 P408 用量为 14%~16%。

2.2.2 P188 用量考察 固定 P407 用量为 15%、聚山梨酯-80 的用量为 1%、1,2-丙二醇质量分数为 15%，在冰浴下加入质量分数为 1%、2%、3%、4%、5% 的 P188，搅拌均匀后于 4℃ 冰箱中溶胀过夜，制备 BGT，测定其胶凝温度。结果 P188 用量为 1%、2%、3%、4%、5% 时，BTG 的胶凝温度分别为 30.6、34.0、36.9、38.2、38.9℃。结果显示，随着 P188 用量的逐渐增大，胶凝温度逐渐增加，因此选择 P188 用量为 1%~4%。

2.2.3 聚山梨酯-80 用量考察 固定 P407 用量为 15%、P188 用量为 2%、1,2-丙二醇质量分数为 15%，在冰浴下加入质量分数为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 的聚山梨酯-80，搅拌均匀后于 4℃ 冰箱中溶胀过夜，制备 BGT，测定其胶凝温度。结果聚山梨酯-80

用量为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 时，BTG 的胶凝温度分别为 35.0、34.0、33.4、32.8℃。结果显示，随着聚山梨酯-80 用量的逐渐增大，胶凝温度逐渐降低，因此选择聚山梨酯-80 用量为 1%~2%。

2.3 Box-Beheken 设计-响应面法 (Box-Beheken design-response surface method, BBD-RSM) 优化 BTG 处方及 SBTG 载药量的确定

2.3.1 BBD-RSM 实验设计及结果 采用 Design-Expert 13 软件，根据单因素实验结果，以 P407 用量 (X_1)、P188 用量 (X_2)、聚山梨酯-80 用量 (X_3) 为影响因素，以胶凝温度 (T) 为评价指标，设计 3 因素 3 水平 BBD-RSM 实验，考察各因素对 BGT 处方的影响，因素水平及结果见表 1。

2.3.2 模型拟合与方差分析 应用 Design Expert 13 软件对 17 组实验结果进行 2 次多项式逐步拟合，得到拟合方程： $T=33.080-4.410 X_1+4.040 X_2-0.150 X_3-0.700 X_1 X_2-0.225 X_1 X_3-0.725 X_2 X_3+1.180 X_1^2-1.170 X_2^2-0.390 X_3^2$ 。自变量与响应值的三维图见图 1，方差分析结果见表 2。可见模型 P 值小于 0.000 1，失拟项 P 值大于 0.05，方差分析相关系数 $R^2=0.990 3$ ，表明方程拟合度和可信度良好。

在回归模型中， F 值越大，表明因素对响应值的影响就越大，因此，各因素对 BTG 胶凝温度的影响顺序为 P407>P188>聚山梨酯-80。通过软件拟

表 1 BBD-RSM 实验设计与结果

Table 1 Experimental design and results of BBD-RSM

试验号	$X_1/\%$	$X_2/\%$	$X_3/\%$	$T/^\circ\text{C}$	试验号	$X_1/\%$	$X_2/\%$	$X_3/\%$	$T/^\circ\text{C}$	试验号	$X_1/\%$	$X_2/\%$	$X_3/\%$	$T/^\circ\text{C}$
1	15 (0)	2.5 (0)	1.5 (0)	33.5	7	15	1.0 (-1)	2.0	28.4	13	14	1.0	1.5	32.8
2	16 (+1)	2.5	1.0 (-1)	30.2	8	15	2.5	1.5	32.6	14	15	2.5	1.5	33.6
3	14 (-1)	2.5	2.0 (+1)	38.0	9	14	2.5	1.0	38.8	15	15	2.5	1.5	32.6
4	14	4.0 (+1)	1.5	42.0	10	15	1.0	1.0	26.3	16	15	2.5	1.5	33.1
5	16	4.0	1.5	32.0	11	15	4.0	1.0	36.1	17	16	1.0	1.5	25.6
6	15	4.0	2.0	35.3	12	16	2.5	2.0	28.5					

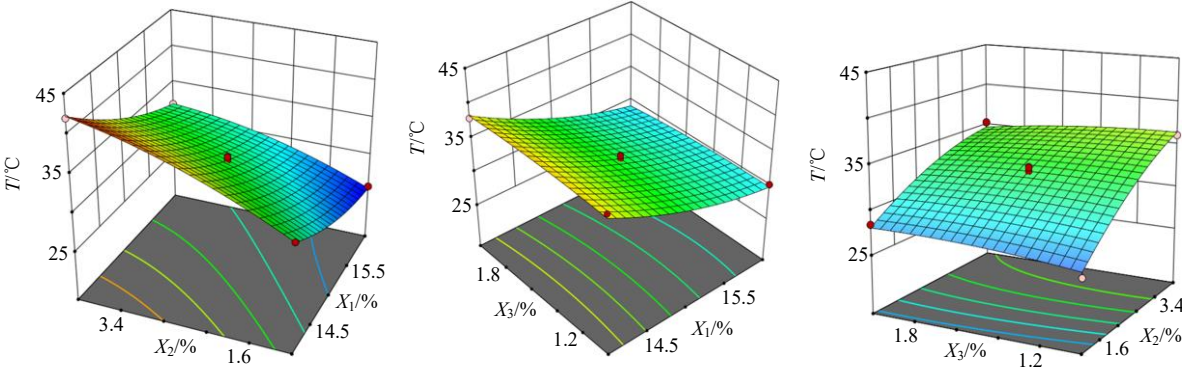


图 1 自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 与响应值 T 的三维图

Fig. 1 Three-dimensional plot of arguments X_1 , X_2 , X_3 and response values T

表 2 各项因素回归系数

Table 2 Regression coefficients of various factors

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	302.30	9	33.59	79.29	<0.000 1	X ₁ ²	5.91	1	5.91	13.96	0.007 3
X ₁	155.76	1	155.76	367.67	<0.000 1	X ₂ ²	5.71	1	5.71	13.49	0.007 9
X ₂	130.41	1	130.41	307.83	<0.000 1	X ₃ ²	0.64	1	0.64	1.51	0.258 6
X ₃	0.18	1	0.18	0.42	0.535 3	残差	2.97	7	0.42		
X ₁ X ₂	1.96	1	1.96	4.63	0.068 5	失拟项	2.06	3	0.69	3.02	0.156 7
X ₁ X ₃	0.20	1	0.20	0.48	0.511 6	净误差	0.91	4	0.23		
X ₂ X ₃	2.10	1	2.10	4.96	0.061 2	总离差	305.27	16			

合优化, 确定最优 BTG 处方为 P407 为 15%、P188 为 2.5%、聚山梨酯-80 为 1.8%、1,2-丙二醇用量为 15%。根据最优处方平行制备 3 批 BTG, 按照“2.1.3”项下方法测定胶凝温度, 平行测定 3 次, 测得凝胶温度分别为 (33.1±0.2)、(33.4±0.1)、(33.2±0.2)℃, 与预测结果 (32.5℃) 相似, 表明该处方稳定可行。

2.3.3 SBTG 载药量的考察 根据“2.3.2”项下的最优 BTG 处方, 考察不同载药量对 SBTG 胶凝温度及外观性状的影响。称取处方量的 1,2-丙二醇、聚山梨酯-80, 分别称取质量分数为 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%的参柏提取物超声溶解于其中, 再加入处方量的 P407、P188 搅拌均匀后, 4℃下溶胀过夜, 制备 SBTG, 比较不同载药量 SBTG 的外观性状、离心稳定性及胶凝温度, 结果如表 3 所示。随着参柏提取物载药量的增加, 凝胶溶液由

澄清逐渐变为浑浊且伴有沉淀, 胶凝温度开始下降, 因此综合考虑外观性状、离心稳定性及胶凝温度, 确定参柏提取物的最佳载药量为 5%。

2.4 SBTG 外观性状及微观形态考察

按照“2.3”项下确定的 BTG 处方及 SBTG 载药量, 平行制备 3 批 SBTG, 观察在温度达到胶凝温度前、后的外观性状。结果 (图 2) 显示, 本品在室温 (25℃) 下为棕黄色较为黏稠且具有流动性的液体, 33℃及以上即转为棕黄色凝胶状半固体。

将 SBTG 制备成冻干粉 (取 SBTG, 于-60℃超低温冰箱预冻 24 h; 后置于-35℃冷冻干燥机中进行冻干, 真空度 10~15 Pa, 冷冻温度-50℃, 冷冻干燥时间 48 h, 即得), 取适量粉末喷金, 在 SEM 下观察 SBTG 内部的微观形态。由图 3 可观察到由胶束堆砌与缠结形成的三维网状结构^[9], 药物可被包封于网状结构中, 符合水凝胶的特点。

表 3 SBTG 载药量考察

Table 3 Investigation on drug loading capacity of SBTG

载药量/%	外观性状	离心稳定性	胶凝温度/℃
1	基质可完全溶胀、提取物完全溶解、溶液澄清	离心稳定、无分层	33.5
2	基质可完全溶胀、提取物完全溶解、溶液澄清	离心稳定、无分层	33.4
3	基质可完全溶胀、提取物完全溶解、溶液澄清	离心稳定、无分层	33.2
4	基质可完全溶胀、提取物完全溶解、溶液澄清	离心稳定、无分层	33.0
5	基质可完全溶胀、提取物完全溶解、溶液澄清	离心稳定、无分层	32.9
6	基质可完全溶胀、提取物部分溶解、溶液较为澄清、静置后有微量沉淀	离心后有提取物沉淀	32.4
7	基质可完全溶胀、提取物部分溶解、溶液浑浊、静置后有少量沉淀	离心后有提取物沉淀	31.7
8	基质可完全溶胀、提取物部分溶解、溶液浑浊、静置后有少量沉淀	离心后有提取物沉淀	31.2



图 2 SBTG 的外观性状

Fig. 2 Appearance character of SBTG

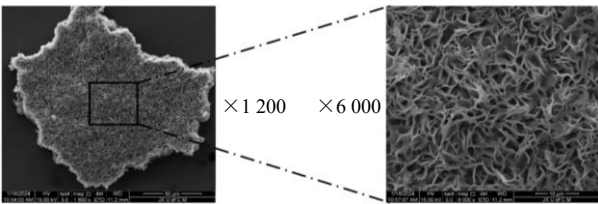


图 3 SBTG 冻干粉的 SEM 图

Fig. 3 SEM image of SBTG freeze-dried powder

2.5 SBTG 流变学评价

取适量 SBTG 置于平行板（直径为 50 mm）上，测试间隙为 1 mm，进行频率扫描分析。

2.5.1 线性应变扫描分析 在振荡扫描模式下，设置应变为 0.01%~100%，角频率为 10 rad/s，温度为 33 °C，测试凝胶的储能模量 (G') 和损耗模量 (G'') 随剪切应变变化的曲线。通过应变扫描可以获得 SBTG 的线性黏弹区，结果如图 4 所示。当应变开始增大时，弹性储能模量 G' 和黏性损耗模量 G'' 保持相对恒定， $G' > G''$ 表明此时凝胶弹性占主导地位；随着应变的持续增大， G' 和 G'' 均呈下降趋势，表明凝胶结构开始出现破坏， G' 迅速降低并低于 G'' ，表明高应变下水凝胶内部的交联结构遭到破坏，凝胶状态转变为溶液状态。因此所有的动态振荡实验都需控制应变在 1% 内，以确保凝胶结构的完整性。

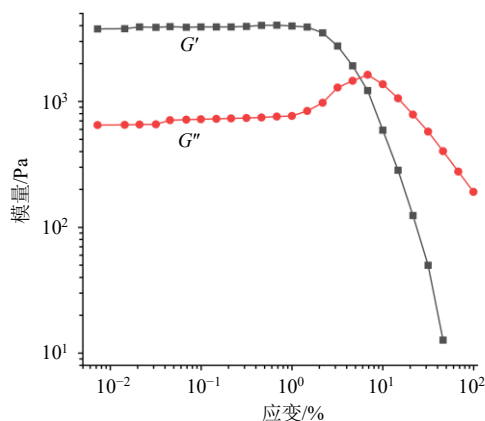


图 4 线性应变扫描考察

Fig. 4 Investigation of linear strain scanning

2.5.2 相变温度测定 设置温度变化为 20~50 °C，升温速率为 2 °C/min，测试 G' 、 G'' 随温度变化的曲线，测定相变温度，曲线交点处温度即视为胶凝温度。由图 5 得知，当温度为 33.3 °C 时， $G' = G''$ ，即为 SBTG 相转变温度。

2.5.3 频率扫描分析 在振荡扫描模式下，温度设定为 33 °C，应变为 1%，在 0.01~100 Hz 对 SBTG 进行扫描，表征凝胶内部结构的稳定性。由图 6 可以得知， G' 始终大于 G'' 且不与其相交，SBTG 表现为黏弹性固体性质且具有稳定的三维网状结构。

2.6 SBTG 体外释药考察

2.6.1 色谱条件 参照文献方法^[15]并稍作改进，以便适用于 SBTG 中指标成分的定量测定。

(1) 苦参碱、氧化苦参碱：色谱柱为 Waters Xbridge C₁₈ 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相

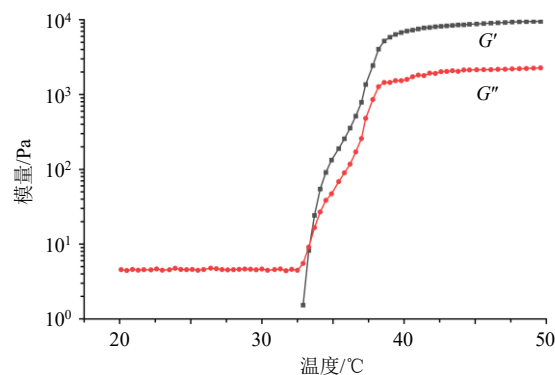


图 5 相变温度考察

Fig. 5 Investigation of phase transition temperature

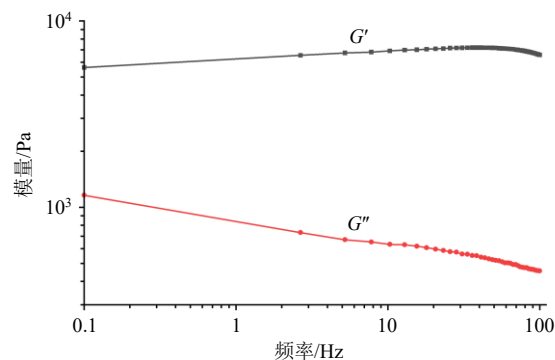


图 6 频率扫描考察

Fig. 6 Investigation of frequency scanning

为乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液（加三乙胺调 pH 值至 6.2±0.1）（10:90），等度洗脱；体积流量 1 mL/min；检测波长 220 nm；进样量 10 μL；柱温 30 °C。

(2) 小檗碱：色谱柱为 Waters Xbridge C₁₈ 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液（用三乙胺调 pH 值至 6.2±0.1）（30:70），等度洗脱；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 265 nm；进样量 5 μL；柱温 30 °C。

2.6.2 对照品溶液的制备 精密称取对照品苦参碱、氧化苦参碱、盐酸小檗碱适量，分别置于量瓶中，流动相溶解，定容，配制成苦参碱、氧化苦参碱、盐酸小檗碱质量浓度分别为 505.50、501.00、230.00 μg/mL 的对照品溶液，4 °C 保存，备用。

精密移取 1 mL 苦参碱储备液和 0.6 mL 氧化苦参碱储备液置于 10 mL 棕色量瓶中，流动相定容，得苦参碱和氧化苦参碱混合对照品溶液，备用。

2.6.3 供试品溶液的制备

(1) 苦参碱、氧化苦参碱：精密称取 SBTG 40 mg 至蒸发皿中，水浴挥干，加 10 mL 水溶解并转移至分液漏斗内，加三氯甲烷振摇提取 3 次，每次

15 mL, 取下层溶液, 水浴挥干, 加流动相溶解, 完全转移至 10 mL 量瓶中, 定容, 即得。

(2) 小檗碱: 精密称取 SBTG 4 mg 至 10 mL 量瓶中, 加流动相溶解, 定容, 即得。

2.6.4 专属性考察 取苦参碱和氧化苦参碱混合对照品溶液、盐酸小檗碱对照品溶液、SBTG 供试品溶液、空白溶剂, 按“2.6.1”项下色谱条件进行分析, 苦参碱、氧化苦参碱色谱图见图 7, 小檗碱色谱图见图 8。在该色谱条件下, SBTG 供试品溶液和对照品溶液中苦参碱、氧化苦参碱、小檗碱的色谱峰具有相同的保留时间, 且能实现完全分离, 其他组分对三者测定无干扰。

2.6.5 线性关系考察 精密吸取“2.6.2”项下对照品溶液适量, 分别稀释至苦参碱质量浓度分别为 505.50、252.75、126.38、31.59、15.80、7.90 $\mu\text{g/mL}$, 氧化苦参碱质量浓度分别为 501.00、250.50、125.25、31.31、15.66、7.83 $\mu\text{g/mL}$, 盐酸小檗碱质量浓度分

别为 230.00、115.00、57.50、28.75、14.38、7.19 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液, 分别按“2.6.1”项下色谱条件进样分析, 得各质量浓度对照品峰面积, 以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 进行线性回归分析, 得苦参碱、氧化苦参碱、盐酸小檗碱的回归方程分别为 $Y=5.985\ 7\ X+10.919$, $R^2=0.999\ 9$; $Y=7.176\ 8\ X+14.086$, $R^2=0.999\ 9$; $Y=18.053\ X-47.995$, $R^2=0.999\ 9$; 结果表明, 苦参碱、氧化苦参碱、盐酸小檗碱的检测质量浓度分别在 7.90~505.50、7.83~501.00、7.19~230.00 $\mu\text{g/mL}$ 呈良好的线性关系。

2.6.6 精密度考察 精密量取苦参碱和氧化苦参碱混合对照品溶液和盐酸小檗碱对照品溶液, 按“2.6.1”项下色谱条件进行分析, 重复 6 次, 测定苦参碱、氧化苦参碱、小檗碱的峰面积, 得其 RSD 分别为 1.02%、0.79%、1.44%, 结果表明仪器精密度良好。

2.6.7 稳定性考察 取“2.6.3”项下供试品溶液, 按“2.6.1”项下色谱条件分别于制备后 0、2、4、6、8、10、12 h 取样, 测定苦参碱、氧化苦参碱、小檗碱的峰面积, 得其 RSD 分别为 1.98%、1.61%、0.53%, 结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.6.8 重复性考察 按“2.6.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按照“2.6.1”项下色谱条件重复测定苦参碱、氧化苦参碱、小檗碱的峰面积, 计算其质量分数的 RSD 分别为 1.16%、1.11%、0.48%, 结果表明该方法重复性良好。

2.6.9 加样回收率考察 精密称取已测定指标成分苦参碱、氧化苦参碱、小檗碱含量的 SBTG 样品 6 份, 按照所得 3 种成分含量分别加入其 1.0 倍量的对照品, 按“2.6.3”项下方法处理样品制备供试品溶液, 并按“2.6.1”项下色谱条件进行分析, 以随行线性回归方程计算其中苦参碱、氧化苦参碱、小檗碱的实测含量, 计算苦参碱、氧化苦参碱、小檗碱的加样回收率及其 RSD 值。结果苦参碱、氧化苦参碱、小檗碱的平均加样回收率分别为 100.62%、100.70%、99.66%, RSD 分别为 0.84%、1.62%、1.25%。

2.6.10 体外释药研究 使用透析袋法研究 SBTG 体外释药情况。精密称取适量参柏提取物溶液 (含苦参黄柏提取物 5%)、SBTG (载药量为 5%) 分别加入透析袋中, 选择 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 作为释放介质, 温度为 $(37.0\pm0.5)^\circ\text{C}$ 、转速为 100 r/min, 分别在 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、6.00、

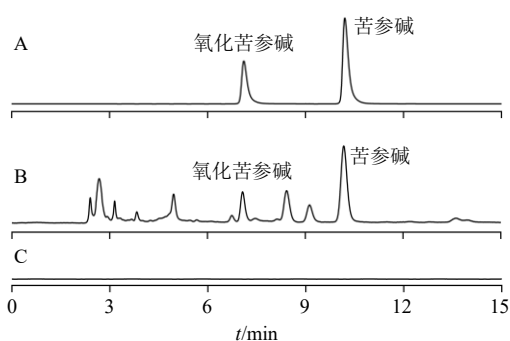


图 7 苦参碱和氧化苦参碱混合对照品溶液 (A)、SBTG 供试品溶液 (B)、空白溶剂 (C) 的 HPLC 图

Fig. 7 HPLC of matrine and oxymatrine mixed reference substances solution (A), SBTG test solution (B), blank solvent (C)

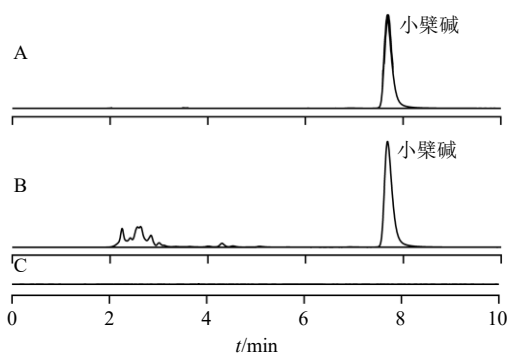


图 8 盐酸小檗碱对照品溶液 (A)、SBTG 供试品溶液 (B)、空白溶剂 (C) 的 HPLC 图

Fig. 8 HPLC of berberine hydrochloride reference substance solution (A), SBTG test solution (B), and blank solvent (C)

8.00 h 取样 1 mL, 每次取样后加入相同温度等量的释放介质, 样品经 0.45 μm 微孔滤膜滤过后, 按上述色谱方法测定释放介质中的苦参碱、氧化苦参碱、小檗碱质量浓度。按照公式计算各指标成分的累积释放率 (cumulative release percentage, Q_n) [20], 绘制药物释放曲线, 结果如图 9 所示。

$$Q_n = (C_n V_n + \sum_{i=0}^{n-1} C_i V_i) / Q_0 \quad (1)$$

Q_0 为参柏提取物溶液或 SBTG 中指标成分质量浓度, C_i 为第 i 个供试品溶液的实测质量浓度, C_n 为第 n 次取样的供试品溶液的实测质量浓度, V_i 为每次取样体积, V_n 为释放介质的总体积

结果显示, 参柏提取物溶液中氧化苦参碱在 2 h 已达到释放平台期, SBTG 中氧化苦参碱在 4 h 时

释放达到平台期, 8 h 时, 参柏提取物溶液与 SBTG 中氧化苦参碱在释放介质中的累积释放率相差较小; 参柏提取物溶液中苦参碱在释放介质中的累积释放度为 $(81.94 \pm 4.48) \%$, SBTG 为 $(86.30 \pm 1.67) \%$, 二者在 8 h 时累积释放度相似; 参柏提取物溶液、SBTG 中小檗碱在释放介质中的累积释放率分别为 $(72.61 \pm 2.90) \%$ 、 $(95.76 \pm 1.12) \%$, 温敏凝胶累积释放度得到显著提升。

对 SBTG 中指标性成分氧化苦参碱、苦参碱、小檗碱体外释放数据进行零级、一级、Higuchi 和 Ritger-Peppas 方程拟合, 其中, 拟合系数越接近 1, 表明拟合效果越好, 结果见表 4, 三者 R^2 与一级动力学模型匹配度更高, 表明 SBTG 在释放过程中以扩散为主[21]。

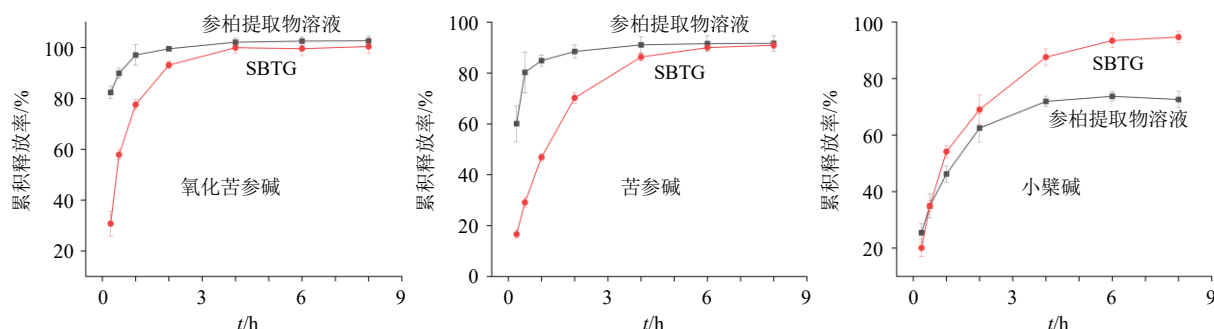


图 9 参柏提取物溶液与 SBTG 中氧化苦参碱、苦参碱、小檗碱的累积释放率

Fig. 9 Cumulative release rates of oxymatrine, matrine and berberine from Shenbai extract solution and SBTG

表 4 SBTG 中 3 种指标成分体外释放模型拟合

Table 4 Fitting of *in vitro* release model of three index components in SBTG

模型	拟合方程		
	氧化苦参碱	苦参碱	小檗碱
零级动力学	$Q_n = 58.900 + 6.760 t$, $R^2 = 0.4869$	$Q_n = 33.540 + 8.980 t$, $R^2 = 0.7202$	$Q_n = 39.300 + 8.690 t$, $R^2 = 0.7336$
一级动力学	$Q_n = 99.390 (1 - e^{-1.590 t})$, $R^2 = 0.9935$	$Q_n = 90.990 (1 - e^{-0.740 t})$, $R^2 = 0.9993$	$Q_n = 93.380 (1 - e^{-0.880 t})$, $R^2 = 0.9889$
Higuchi	$Q_n = 25.640 t^{1/2} + 39.970$, $R^2 = 0.7885$	$Q_n = 32.580 t^{1/2} + 10.710$, $R^2 = 0.8778$	$Q_n = 31.450 t^{1/2} + 17.340$, $R^2 = 0.8874$
Ritger-Peppas	$Q_n = 67.920 t^{0.23}$, $R^2 = 0.7885$	$Q_n = 45.530 t^{0.38}$, $R^2 = 0.9073$	$Q_n = 50.960 t^{0.340}$, $R^2 = 0.9271$

2.7 SBTG 体内药效评价

2.7.1 痔疮模型大鼠的造模及给药 取 SD 大鼠 60 只, 适应性喂养 1 周后, 随机分为空白组、模型组、阳性药组、SBTG 组、BTG 组共 5 组, 每组 12 只。除空白组外, 所有大鼠均建立巴豆油诱导剂 [将去离子水、吡啶、乙醚和 6% 巴豆油 (乙醚溶解) 以 1:4:5:10 的比例制成巴豆油诱导剂 (COP)] 诱发痔疮模型[22]。造模前将大鼠禁食 12 h, 造模时, 轻柔按摩大鼠腹部, 排出粪便后, 将浸有 160 μL COP 的无菌棉签插入大鼠肛门 (肛门直肠部分, 距肛门 20 mm) 10 s。7~8 h 后, 观察大鼠肛门水肿情况,

若大鼠肛周组织充血肿胀并有炎性渗出, 即造模成功。空白组与模型组直肠给予生理盐水; 阳性药组给予马应龙麝香痔疮膏 1.0 g/(kg·d)[23]; SBTG 组与 BTG 组给予对应凝胶 1.8 g/(kg·d) (SBTG 组相当于含生药量苦参 10 g、黄柏 10 g), 每天给药 2 次[24]。

2.7.2 大鼠血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的测定 给药 1 周后大鼠禁食 12 h 取材, 异氟烷麻醉大鼠后, 腹主动脉取全血置于含有抗凝剂的采血管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 4 h 后, 3 000 r/min 离心 (离心半径 9.7 cm) 15 min, 分取上层血清。根据 ELISA 试剂盒说明书操作, 进行 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 指标的测定。由表 5

表 5 大鼠血清炎症因子测定结果及大鼠直肠肛周肿胀度及直肠系数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Rat serum inflammatory factor assay results and rectal and anal swelling and rectal coefficient in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	IL-1β/(pg·mL ⁻¹)	肛周肿胀度/mm	直肠系数
空白	—	13.28±1.86	48.42±11.38	8.31±2.39	1.07±0.10	0.10±0.01
模型	—	57.65±2.88***	536.63±61.14***	78.65±7.78***	2.11±0.32***	0.18±0.04***
阳性药	1.0	27.01±2.21###	170.16±23.23###	25.36±4.45###	1.31±0.13###	0.13±0.02###
SBTG	1.8	34.36±2.32###	242.43±43.98###	28.70±4.58###	1.37±0.12###	0.13±0.01###
BTG	1.8	54.31±3.34	525.10±52.12	74.93±9.25	2.10±0.22	0.17±0.03

与空白组比较：*** $P < 0.001$ ；与模型组比较：### $P < 0.001$ ；表 7 同。
 *** $P < 0.001$ vs blank group; ### $P < 0.001$ vs model group; same as table 7.

可知，与空白组比较，模型组 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平显著升高 ($P < 0.001$)，表明痔疮模型的成功建立。与模型组相比，阳性药与 SBTG 组可显著降低大鼠血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平 ($P < 0.001$)；而 BTG 组无显著性差异，但有下降趋势。结果表明，SBTG 能抑制炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 的表达。

2.7.3 大鼠肛周肿胀度、直肠系数的测定 按“2.7.2”项下方法处死大鼠后，采集肛门直肠组织，使用 4℃ 预冷 PBS 冲洗直肠腔道。空白组大鼠肛门回缩正常，无水肿等异常情况。大鼠在造模 6 h 后肛周肿胀明显，肛门潮湿湿度增加且黏液溢出增多，偶见轻度糜烂，排泄物积滞带血；经阳性药及 SBTG 给药后可观察到大鼠肛周肿胀程度明显降低，黏液分泌、糜烂、便秘及出血等症状均得到明显改善。取出直肠后，发现模型组及 BTG 组大鼠直肠肛管出血肿胀明显，粪便积结滞留于结肠和直肠、膨胀变形明显、出现增生性肥厚，并明显失去弹性；给药组出血肿胀及粪便积结滞留情况显著改善。

照十字法测量大鼠肛门直径，取其平均值即为肛周肿胀度。通过测量各组大鼠肛门直径，取其平均值，结果见表 5。与空白组比较，模型组造模后肛周肿胀度显著增加 ($P < 0.001$)。与模型组比较，阳

性药组及 SBTG 组的肛周肿胀度均显著降低 ($P < 0.001$)，BTG 组与模型组肿胀度相比无显著性差异。

直肠系数可在一定程度反映组织肿胀程度，越大代表组织肿胀程度越高。将取下并冲洗干净的直肠组织用滤纸吸干水分后，称定质量，记为直肠湿质量。直肠系数为直肠湿质量与大鼠体质量的比值。如表 5 所示，与空白组比较，模型组大鼠直肠系数显著增加 ($P < 0.001$)。与模型组比较，阳性药组与 SBTG 组均可显著降低大鼠直肠系数 ($P < 0.001$)，BTG 组直肠系数与模型比较无显著性差异。

2.7.4 大鼠直肠组织病理学观察 经固定的直肠组织通过脱水、包埋、切片、脱蜡、染色、脱水、切片等方法进一步处理，以获得 4 μm 的薄片，在显微镜下检查直肠组织的病理变化。大鼠直肠组织病理切片结果如图 10 所示，空白组大鼠直肠组织各层结构清楚，黏膜层可见黏膜上皮为单层柱状上皮，上皮完整，固有层中肠腺数量丰富，形态规则，杯状细胞数量丰富，黏膜下层内结缔组织细密，无明显的异常，肌层可见肌纤维着色均匀，排列紧密，肌层、浆膜层均无明显的异常，未见明显的病理改变。模型组及 BTG 组大鼠直肠组织黏膜上皮层坏死糜烂、部分腺体消失，杯状细胞缺失，周围可见轻度反应性增生，大量浆细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润至

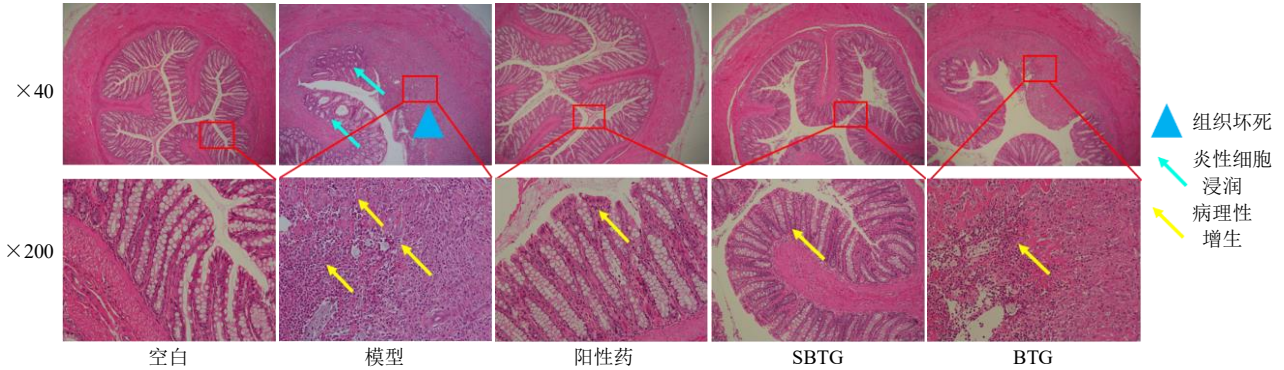


图 10 大鼠直肠组织病理切片图

Fig. 10 Pathological section of rat rectal tissue

黏膜下层,提示血管受损,肌层增厚,平滑肌细胞纤维排列稀疏。阳性药组及 SBTG 组黏膜较为完整,可观察到腺体及大量杯状细胞,鳞状上皮和肠上皮组织相对较完整,炎性细胞浸润明显减少,黏膜下层、肌层、浆膜层损伤程度较小,提示 SBTG 对急性炎症反应及组织损伤具有治疗及保护黏膜作用。

2.8 SBTG 体内作用机制探究

2.8.1 RT-qPCR 检测大鼠直肠组织中 *HIF-1α*、*VEGF*、*MMP9*、*TIMP1* mRNA 表达 取出-80℃保存的部分肛门直肠组织,根据 RNA 提取试剂盒说明书步骤,提取总 RNA。将提取所得 RNA 经逆转录试剂盒合成 cDNA。以逆转录所得 cDNA 为模板,以 β -actin 为内参,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各指标 mRNA 相对表达量。引物序列由上海生工生物工程有限公司设计合成,引物序列见表 6。由表 7 可知,与空白组相比,模型组及 BTG 组 *HIF-1α*、*VEGF*、*MMP9* mRNA 相对表达量均显著上升 ($P<0.001$), *TIMP1*

mRNA 相对表达量显著下降 ($P<0.001$),且 BTG 与模型组相比无显著性差异。与模型组比较,阳性药组及 SBTG 组 *HIF-1α*、*VEGF*、*MMP9* mRNA 相对表达量均显著下降 ($P<0.001$), *TIMP1* mRNA 相对表达量显著上升 ($P<0.001$)。

表 6 引物序列

Table 6 Primer sequence

基因	序列 (5'→3')
<i>HIF-1α</i>	F: CGCCACCACCACTGATGAATC
	R: GTACCACTGTATGCTGATGCCTTAG
<i>VEGF</i>	F: GAGCGGAGAAAGCATTGTGTTGTC
	R: CGCCTTGGCTTGTCACATCTG
<i>MMP9</i>	F: CAAACCCTGCGTATTTCCATTTCATC
	R: TCGAGTAGGACAGAAGCCATACAG
<i>TIMP1</i>	F: ATGGAGAGCCTCTGTGGATATGTC
	R: TATGCCAGGGAACCAGGAAGC
β -actin	F: CACTTTCTACAATGAGCTGCG
	R: CTGGATGGCTACGTACATGG

表 7 大鼠直肠组织中 *HIF-1α*、*VEGF*、*MMP9*、*TIMP1* mRNA 及 *HIF-1α*、*MMP9*、*TIMP1* 蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 7 Relative expression of *HIF-1α*, *VEGF*, *MMP9*, *TIMP1* mRNA and *HIF-1α*, *MMP9*, *TIMP1* protein in rat rectal tissue ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	mRNA 相对表达量				蛋白相对表达量		
		<i>HIF-1α</i>	<i>VEGF</i>	<i>MMP9</i>	<i>TIMP1</i>	<i>HIF-1α</i>	<i>MMP9</i>	<i>TIMP1</i>
空白	—	0.98±0.19	1.02±0.05	1.00±0.13	0.98±0.14	0.41±0.07	0.75±0.07	0.94±0.09
模型	—	5.81±0.29***	2.14±0.20***	3.90±0.11***	0.29±0.10***	0.98±0.03***	1.21±0.06***	0.12±0.06***
阳性药	1.0	3.02±0.13###	1.39±0.21###	2.37±0.36###	0.78±0.12###	0.53±0.04###	1.08±0.03	0.64±0.04###
SBTG	1.8	3.13±0.12###	1.48±0.25###	2.51±0.32###	0.74±0.12###	0.42±0.05###	0.83±0.06###	0.62±0.07###
BTG	1.8	5.70±0.32***	2.17±0.12***	3.89±0.12***	0.26±0.07***	0.50±0.07	1.18±0.10	0.10±0.07

2.8.2 Western-Blotting 检测大鼠直肠组织中 *HIF-1α*、*MMP9*、*TIMP1* 的表达 取大鼠直肠组织提取总蛋白,定量进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,湿法转膜,5%脱脂奶粉,室温条件下封闭 2 h,一抗 β -actin (1:5 000)、 β -tubulin (1:1 000)、*HIF-1α* (1:1 000)、*MMP9* (1:1 000)、*TIMP1* (1:1 000),摇床 60 r/min 4℃孵育过夜,室温下孵育二抗 2 h,加入 ECL 发光液进行显色检测,利用 Image J 软件进行蛋白条带灰度值检测。

由图 11 及表 7 可知,与空白组相比,模型组 *HIF-1α*、*MMP9* 蛋白表达水平显著上升 ($P<0.001$), *TIMP1* 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.001$)。与模型组相比,阳性药组 *HIF-1α* 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.001$), *TIMP1* 显著上升 ($P<0.001$); SBTG 组 *HIF-1α*、*MMP9* 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.001$), *TIMP1* 显著上升 ($P<0.001$)。

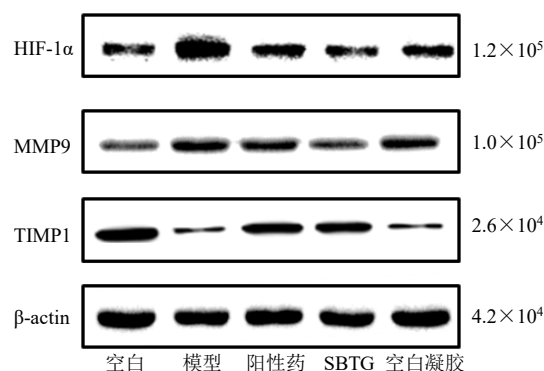


图 11 各组大鼠直肠组织蛋白表达情况

Fig. 11 Rat rectal tissue protein expression in each group

2.9 统计学方法

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 值表示,采用 Graphpad Prism 8 软件进行统计学分析。组间差异通过 One-way ANOVA 进行检验。当 $P<0.05$ 时,判定组间具有显著性差异。

3 讨论

痔疮作为一种常见的肛肠疾病，临床上常表现为肛门出血、坠胀、疼痛及瘙痒等症状。在治疗上，大多数患者都首选药物治疗，以减轻症状、促进康复。肛门给药使药物能够直接作用于痔疮病灶部位，这种局部给药方式能够迅速提高药物在病灶部位的浓度，使药效得以充分发挥。

相较于传统的痔疮栓剂，温敏凝胶肛门给药操作简单，使用难度低；不会对患处造成额外的摩擦和压迫，降低患者的不适感；具有良好的贴合性，无需担心药物脱落或移位，提高了患者的生活质量。温敏凝胶剂能够随着温度的变化实现从液态到凝胶状态的转变，紧密贴合肛门周围的黏膜，显著提高局部药物浓度，具有延长药物的作用时间、实现定位给药等优势，尤其适合作为中药提取物的给药载体。P407、P188 是由聚氧乙烯 (PEO)、聚氧丙烯 (PPO) 组成的 PEO-PPO-PEO 非离子型三嵌段聚合物，P407 因良好的生物相容性，广泛用于提高难溶药物的溶解度。但仅使用 P407 作为凝胶基质制备的温敏凝胶胶凝温度较低，且高浓度 P407 对黏膜有刺激性^[25]，因此加入 P188 作为温度调节剂。当 P407 中加入少量 P188 时，PEO、PPO 质量比改变，进一步影响凝胶温度^[19]。因而本研究选择 P407、P188、聚山梨酯-80、1,2-丙二醇联合使用，可有效提高载药量。此外温敏凝胶的亲水性符合氧化苦参碱与苦参碱的溶解性，而脂溶性的小檗碱加入增溶剂聚山梨酯-80 能增加其溶解度^[26]，P407 搭配 P188、聚山梨酯-80、1,2-丙二醇联合使用，可有效提高载药量。

药效研究结果显示，通过大鼠肛周及直肠形态观察、大鼠直肠组织病理切片结果可知，阳性药组及 SBTG 组可以显著降低大鼠肛周及直肠的肿胀情况。巴豆油诱导剂的应用，能够引发大量炎症细胞的迁移，进一步加剧了炎症反应过程。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 作为典型的促炎因子^[27]，会加重炎症细胞浸润^[28]。TNF- α 上调会破坏肠上皮屏障，促进 IL-6、IL-1 β 产生。IL-1 β 具有促进炎症细胞分泌、活化的作用，可使中性粒细胞向肠道炎症部位聚集，加重肠道炎症反应；IL-6 的过表达会导致肠上皮细胞电解质分泌，皮内细胞肿胀，肠道通透性增强，中性粒细胞浸润炎症组织^[29]。炎症引发肛周直肠组织部分氧需求上升、血管收缩，致供氧减少，形成低氧微环境。低氧环境下，HIF-1 α 被激活并诱导高表

达，促进血管新生和通透性^[30-32]。新生血管导致痔组织充血、增大，并可能引发水肿、出血^[33]。痔疮患者肛垫中 MMP9 高表达^[34-35]，降解胶原与弹性蛋白，刺激血管再生，破坏血管壁，加重痔疮。TIMP1 作为 MMP9 的抑制剂，可防止肛垫结构降解^[36]。因此炎症反应既可能是痔疮反复发作的潜在诱因，也是痔疮发作的直接体现。SBTG 能够有效抑制炎症因子的释放，从而减轻直肠炎症，表明 SBTG 对痔疮的治疗效果与其抑制促炎细胞因子活性相关。通过抑制促炎因子作用，SBTG 有助于缓解痔疮症状，促进组织修复，从而实现对痔疮的有效治疗。RT-qPCR 及 Western-Blotting 结果表明，SBTG 可显著降低 HIF-1 α 、MMP9 蛋白的表达量，提高 TIMP1 蛋白表达量，从而抑制因缺氧导致直肠血管病理性增生、肛垫组织中弹性蛋白降解导致肛垫下移的现象。

综上，SBTG 处方及制备工艺简单、可行性高，提高患者用药舒适度的同时，具有良好的稳定性，且对巴豆油诱导剂诱导的痔疮模型大鼠肛门直肠组织损伤具有保护作用，证实 SBTG 在痔疮治疗中可能具备显著的疗效。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 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.
- [2] Fišere I, Groma V, Svirskis Š, et al. Evaluation of clinical manifestations of hemorrhoidal disease, carried out surgeries and prolapsed anorectal tissues: Associations with ABO blood groups of patients [J]. *J Clin Med*, 2023, 12(15): 5119.
- [3] Melincovici C S, Bosca A B, Susman S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis [J]. *Rev Roum De Morphol Embryol*, 2018, 59(2): 455-467.
- [4] 张翔, 白景舒. 痔发病机制诊断和治疗概述 [J]. 中国肛肠病杂志, 2019, 39(9): 72-74.
- [5] 吴琼, 高记华, 戚文月, 等. 基于数据挖掘探讨中药熏洗促进肛瘻术后创面愈合用药规律 [J]. 中国中医药信息杂志, 2023, 30(2): 20-25.
- [6] 白克运, 解广东, 白煜杨, 等. 基于中医传承辅助平台分析痔术后熏洗中药复方的用药规律 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2019, 21(12): 2819-2824.
- [7] 李振, 俞科贤. 苦参多路径抗冠状病毒的机制探究 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 888-894.
- [8] 罗磊. 苦柏洗剂对肛周脓肿术后创面愈合的临床疗效观察 [D]. 哈尔滨: 黑龙江省中医药科学院, 2018.

- [9] 戚文月, 高记华, 田茂生, 等. 痛痒消洗剂对肛瘘术后创伤大鼠创面愈合的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(3): 1246-1249.
- [10] 陈莹璐, 徐月, 毛敏, 等. 二黄苦参汤治疗肛门瘙痒症疗效观察 [J]. 实用中医药杂志, 2022, 38(4): 678-679.
- [11] Tang Z X, Luo J L, Faqir Y, *et al.* Berberine hydrochloride-loaded dung beetle chitosan/sodium alginate microspheres ameliorate DSS-induced colitis and regulate gut microorganisms in mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 255: 128219.
- [12] 陆平祝, 常楚瑞, 龙庆德. 苦参生品及麸炒品水提液抗炎镇痛作用初步研究 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(8): 1908-1910.
- [13] 刘洋, 冉聪, 游桂香, 等. 川黄柏中盐酸小檗碱 HPLC 测定优化及其抑菌活性评价 [J]. 中国农业科技导报, 2020, 22(2): 179-186.
- [14] 杨婷, 张莉君, 黄睿, 等. 中药活性成分调控血管新生的研究进展 [J]. 药学学报, 2020, 55(9): 1995-2007.
- [15] 管咏梅, 陶颖, 邹成玉, 等. 苦参-黄柏药对的提取工艺研究 [J]. 中国药房, 2024, 35(7): 793-800.
- [16] 范冉冉, 刘原兵, 张婷, 等. 基于临床需求的温敏凝胶在不同给药部位的应用研究进展 [J]. 药学学报, 2022, 57(5): 1235-1244.
- [17] 何贤会, 杨培昕, 卢小鸾, 等. 用于阴道黏膜给药的纳米胶束复合温敏水凝胶的制备及性能评价 [J]. 材料导报, 2023, 37(19): 218-224.
- [18] 杨丽娜, 万志艳, 陶颖, 等. 复方葛根温敏凝胶的制备与体外评价研究 [J]. 中南药学, 2023, 21(12): 3210-3218.
- [19] 王超君, 卓阳, 卢芳芳, 等. 温敏凝胶材料成胶机制的研究进展 [J]. 中国药房, 2013, 24(37): 3545-3547.
- [20] 安中原, 冯白茹, 申茹, 等. 双黄补温敏凝胶的制备及体外释放考察 [J]. 中医药导报, 2024, 30(3): 75-79.
- [21] 吕凤娇, 蔡菊虹, 陈西林, 等. 黄芩苷壳寡糖纳米粒的体外释放与模型 [J]. 泉州师范学院学报, 2021, 39(6): 1-6.
- [22] Zhang H, Yao X Y, Zhang D F, *et al.* Anti-hemorrhoidal activity of Lian-Zhi-San, a traditional Chinese medicine, in an experimental hemorrhoidal model in rats [J]. *J Integr Med*, 2021, 19(1): 42-49.
- [23] 张雪琴. 四黄痔疮膏对大鼠痔相近动物模型的影响及作用机制研究 [D]. 昆明: 云南中医学院, 2015.
- [24] 曹卫正, 杨亚会. 中医挂线疗法结合中药熏洗治疗复杂性肛瘘的临床效果 [J]. 临床医学研究与实践, 2022, 7(15): 122-125.
- [25] 李鹏跃, 杜守颖, 陆洋, 等. 生物黏附递药系统的研究进展及其在中药领域的应用 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(24): 4687-4693.
- [26] Brown L, Wolf J M, Prados-Rosales R, *et al.* Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(10): 620-630.
- [27] Garg P. Hemorrhoid treatment needs a relook: More room for conservative management even in advanced grades of hemorrhoids [J]. *Indian J Surg*, 2017, 79(6): 578-579.
- [28] 林雄. 基于 MAPK/NF- κ B 信号通路研究苍术对小鼠溃疡性结肠炎的药效及机制 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2022.
- [29] 杨影, 陈东升, 赵艾艾, 等. TNF- α 和 VEGF 协同作用小鼠胚胎干细胞衍生的血管内皮祖细胞促伤口愈合 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2024, 40(2): 240-250.
- [30] 王楚矗, 王信, 于敏敏, 等. 基于 PI3K/Akt/HIF-1 α 通路探讨桂枝茯苓胶囊-散结镇痛胶囊-宫血宁胶囊联用抑制子宫腺肌病进展的作用机制 [J]. 中草药, 2024, 55(3): 842-852.
- [31] Felmeden D C, Blann A D, Lip G Y H. Angiogenesis: Basic pathophysiology and implications for disease [J]. *Eur Heart J*, 2003, 24(7): 586-603.
- [32] 袁有才, 张效科, 高碧峰, 等. 新葛根芩连汤对糖尿病大鼠海马 HIF-1 α 及 VEGF 的影响 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(2): 269-271.
- [33] 王璇, 陈林珍, 林瑞超, 等. 重楼皂苷 I 对斑马鱼发育毒性、抗血管新生活性及其机制研究 [J]. 中草药, 2023, 54(14): 4548-4555.
- [34] 秦蕾, 秦鑫. MMP-9、VEGFR2 因子在内痔患者组织中的表达及意义 [J]. 中国细胞生物学学报, 2020, 42(10): 1800-1805.
- [35] 戴浩. 十全育真汤加减对脱垂性内痔组织中 MMP-7、MMP-9 的影响 [D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2020.
- [36] 郑秋含, 杜连云, 张众, 等. 基于 PI3K/AKT 信号通路探究红景天-鬼箭羽药对对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞的作用机制及配伍规律 [J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(8): 875-881.

[责任编辑 郑礼胜]