

痔断根片治疗痔疮的药效学实验研究及对结肠黏膜组织AQP1表达的影响

赵平, 黄华, 丁旭枫, 卫军, 蒋捷, 季利江

[摘要] 目的 研究痔断根片抗炎、镇痛、通便和止血作用,对结肠黏膜组织水通道蛋白1(aquaporin1, AQP1)表达的影响,明确其药效特点,为临床定位提供可靠的实验依据。方法 采用二甲苯诱导的耳肿胀急性炎症模型研究其抗炎作用;采用乙酸诱导的疼痛模型研究其镇痛作用;采用洛派丁胺诱导的便秘小鼠研究其对肠胃蠕动的影 响;采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测对各组便秘小鼠结肠黏膜中AQP1 mRNA表达的影响;采用小鼠止血、凝血试验研究其止血作用。结果 痔断根片可以减轻二甲苯引起的小鼠耳廓肿胀,且肿胀抑制率随剂量增加而提高;能减少乙酸引起小鼠疼痛的扭体次数;缩减便秘小鼠首粒黑便的排出时间,增加5 h内黑便粒数和粪便含水量;可以显著降低结肠黏膜组织中AQP1 mRNA表达;此外,还可以缩短小鼠止血时间和凝血时间。结论 痔断根片具有显著的抗炎、镇痛作用,润肠通便,增加结肠黏膜组织AQP1表达,促进止血,为痔断根片进一步推广提供了依据。

[关键词] 痔断根片;小鼠;抗炎;镇痛;肠胃蠕动;止血;水通道蛋白1

[中图分类号] R266

[文献标志码] A

[文章编号] 2095-3097(2021)05-287-4

doi: 10.3969/j.issn.2095-3097.2021.05.003

Pharmacodynamic study of Zhiduangen Pian in treating hemorrhoids and its effect on expression of AQP1 in colonic mucosa

ZHAO Ping, HUANG Hua, DING Xufeng, WEI Jun, JIANG Jie, JI Lijiang

(Coloproctological Dept, Changshu Municipal Hospital of TCM, Affiliated to Nanjing University of TCM, Nanjing Jiangsu 215500, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the anti-inflammatory, analgesic, cathartic, and hemostatic effects of Zhiduangen Pian in the treatment of hemorrhoids, and its effect on the expression of Aquaporin 1 (AQP1) in colonic mucosa. **Methods** The xylene induced ear swelling model was used to study the anti-inflammatory effect of Zhiduangen Pian. The acetic acid induced pain model was used to evaluate the analgesic effect. The constipation mice model induced by loperamide was used to evaluate the peristalsis effect. The expression of AQP1 mRNA in colonic mucosa of constipation mice was detected by real-time fluorescent quantitative PCR. The hemostasis effect was study via hemostasis and coagulation test. **Results** Zhiduangen Pian can significantly inhibit the swelling of auricle caused by xylene with dosage dependent. Zhiduangen Pian can reduce the times of painful twisting induced by acetic acid, and resist the pain response. Zhiduangen Pian can reduce the cacation time of the first black stool in constipated mice, and increase the number of black stool particles and the water content of feces within 5 hours. Zhiduangen Pian can induce the expression of AQP1 mRNA in colonic mucosa. Zhiduangen Pian can shorten the hemostasis time and coagulation time in mice. **Conclusion** Zhiduangen Pian has significant anti-inflammatory, analgesic, and laxative effects, and it can increase the expression of AQP1 in colonic mucosa and promote hemostasis. This study provides a basis for further promotion of Zhiduangen Pian.

[Key words] Zhiduangen Pian; Mice; Anti-inflammatory; Analgesic; Peristalsis of intestine and stomach; Hemostasis; Aquaporin 1

痔疮是肛肠科常见病和多发病,发病率约占肛肠疾病50%^[1-2]。由于不规律的生活作息、不良的饮食习惯,痔疮发病率逐年上增,严重地影响着人们的健康和生 活质量^[3]。

痔断根片是常熟市中医医院多年治疗痔疮的经验用药,治疗风伤络脉、湿热下注证痔病,能够极大改善内痔患者症状,起到促进止血、缓解疼痛、促

进痔黏膜修复等作用,对内痔治疗效果尤其显著^[4]。前期研究表明,痔断根片相较于地奥司明片内痔患者出血、疼痛、坠胀感的临床症状明显减少,且能显著减少患者痔核脱出、减小痔核体积^[4-5]。已有研究表明,痔断根片对痔疮治疗有显著的临床效果,但其相关的药效学研究仍未有报道,阻碍了痔断根片的进一步推广及应用。本研究通过各病理模型小

[基金项目] 中国民族医药学会科研项目(2019KYXM-Z1116-75);苏州市临床重点病种诊疗技术专项项目(LCZX202022);苏州市科技发 展计划(SYSD2018199);常熟市中医医院青年科研基金项目(eszyy003)

[作者单位] 215500 江苏常熟,南京中医药大学常熟附属医院肛肠科(赵平,黄华,丁旭枫,卫军,蒋捷,季利江)

[通讯作者] 季利江, E-mail: 2395633826@qq.com

鼠探究了痔断根片在抗炎、镇痛、止血和促进肠蠕动的作用,总结报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 阿司匹林肠溶片,购自拜耳医药保健有限公司,批号:BJ27286;洛派丁胺盐酸盐,Sigma-al-drich公司,货号:L4752;乳果糖口服溶液(杜密克),购自 Abbott Biologicals B.V.(荷兰);二甲苯,购自南京化学试剂厂,批号:010920;乙酸,购自南京化学试剂股份有限公司,批号:150923844E;SPF级 ICR 小鼠共 240 只,体质重 18~22 g,雌雄各半,购自扬州大学,动物生产许可证号:SCXK(苏)2017-0001,实验动物合格证号:NO.201807019;小鼠饲养于清洁动物实验房,采用架式笼养,环境温度 24~26 ℃,相对湿度 50%~60%;紫外分光光度计,购自上海仪器科技有限公司,型号:UV-1100;电子天平,购自德国赛多利斯集团,型号:BSA124S-CW;实时荧光定量 PCR 仪,购自美国 Bio-rad,型号:CFX96。

1.2 方 法

1.2.1 痔断根片制备 痔断根片混悬液:南京中医药大学常熟附属医院肛肠科制备,采用的药材均从先声再康江苏药业有限公司(南京学衡路药店)购买。取黄连 45 g,黄芩 45 g,当归 45 g,地榆炭 45 g,火麻仁 75 g,生地 75 g,防风 45 g,龟板 15 g,珍珠粉 20 g,加入 10 倍量水,煎煮 1 h 后过滤,并浓缩滤液小于 500 mL;再加入经粉碎并过 200 目筛的荆芥炭 4 500 g,生大黄 45 g,槐米炭 75 g,制得浓度为 0.72 g 生药/mL 的痔断根片混悬液,分装-20 ℃保存,待用。

1.2.2 抗炎实验 取 ICR 小鼠 50 只,雌雄各半,随机平均分为 5 组,分组与处理如下:①模型对照组:生理盐水 20 mL/kg;②阳性对照组:阿司匹林 0.05 g/kg;③痔断根片低剂量组:1.8 g 生药/kg;④痔断根片中剂量组:3.6 g 生药/kg;⑤痔断根片高剂量组:7.2 g 生药/kg。各组小鼠每天用药物灌胃 1 次,连续 3 d。末次给药 1 h 后,在小鼠右耳两侧涂抹 0.10 mL 二甲苯。涂药 1 h 后,处死小鼠并切断左右耳。用打孔器在两耳同一部位取出圆状耳片,再用电子天平计算两个耳片的重量,比较各组耳壳肿胀程度(右耳片重量-左耳片重量),计算各组小鼠肿胀抑制率:肿胀抑制百分率(%)=(给药组小鼠耳壳肿胀度/模型对照组小鼠耳壳肿胀度)×100%。

1.2.3 镇痛实验 取 ICR 小鼠 50 只随机分为 5 组,分组与处理同 1.2.2。各组末次给药 1 h 后,用 0.5% 乙酸注射入腹腔。30 min 后,观察各组小鼠出现扭体反应的数量以及次数,实验结束后处死。

1.2.4 促排便实验 取 ICR 小鼠 60 只,雌雄各半,随机平均分为 6 组,分组与处理如下:①空白对照组:生

理盐水 10 mL/kg;②模型对照组:生理盐水 10 mL/kg;③阳性对照组:乳果糖口服溶液,5.0 mL/kg;④痔断根片低剂量组:1.8 g 生药/kg;⑤痔断根片中剂量组:3.6 g 生药/kg;⑥痔断根片高剂量组:7.2 g 生药/kg。除阳性对照组外,各组每日灌胃给药 1 次,连续 3 d,阳性对照组于洛派丁胺给药 1 h 前给予乳果糖口服溶液。末次给药 1 h 后,空白对照组灌胃给予冷开水 10 mL/kg,其余组灌胃给与洛派丁胺 5 mg/kg(0.05% CMC-Na 配制,0.5 mg/kg)构建小鼠便秘模型,同时所有组别给与 0.1 mL 印度墨汁,观察首粒黑便时间及 5 h 内的黑便数目。另外在造模给药前,收集各组新鲜粪便 2~5 粒,测定粪便含水量。含水量计算公式:含水量=(湿粪-干粪)/湿粪×100%

1.2.5 qRT-PCR 检测结肠黏膜组织水通道蛋白 1 (aquaporin1, AQP1) mRNA 表达 将用于促排便实验的各组小鼠脱颈处死。取结肠黏膜组织约 100 mg,加入裂解液,并用匀浆机破碎,提取总 RNA。以 β-actin 作为内标,采用 qRT-PCR 检测 AQP1 在结肠黏膜组织中的表达水平。引物 AQP1 正义链为 5'-GGAGATGAAGCCCAATAGAG-3',反义链为 5'-GCTCTGAGACCAGGAAACAGA-3';β-actin 正义链 5'-GGGACCTGACTGACTACCTC-3',反义链 5'-TCATACTCCTGCTTGCTGAT-3'。

1.2.6 止血、凝血实验 取 ICR 小鼠 40 只,雌雄各半,随机平均分为 4 组,分组与处理如下:①空白对照组:生理盐水 20 mL/kg;②痔断根片低剂量组:1.8 g 生药/kg;③痔断根片中剂量组:3.6 g 生药/kg;④痔断根片高剂量组:7.2 g 生药/kg。各组小鼠每天用药物灌胃 1 次,连续 3 d。末次给药 1 h 后,将小鼠尾尖切下约 3 mm,计算出血时间。每隔 3 s 用滤纸轻轻触碰伤口,直到伤口没有血液渗出的时间为小鼠出血时间。取 ICR 小鼠 40 只,雌雄各半,随机平均分为 4 组,分组和给药方式同上,末次给药后,采用眼科镊取血,取第 2 滴血置于干净的玻璃片上,隔 3 s 观察血滴是否有血丝,观察到有血丝出现的时间作为凝血时间。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 21.0 软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 痔断根片对小鼠耳肿胀的影响 痔断根片高、中、低剂量组的耳廓肿胀程度比模型对照组显著减轻($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);肿胀抑制率随着痔断根片用药量的增加而增加,低、中剂量组的肿胀抑制率比阳性对照组低,但差异不显著;痔断根片大剂量对小鼠耳廓肿胀的抑制程度优于阿司匹林。

2.2 痔断根片对小鼠疼痛的影响 与表 1 模型对照

组相比,由乙酸引起的小鼠扭体反应在痔断根片高、中剂量组显著减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与阳性对照组比较,痔断根片高剂量组小鼠的扭体反应次数也能明显降低($P<0.05$),表明痔断根片可以减轻乙酸引起的小鼠疼痛反应,有一定的镇痛效果,表2。

2.3 痔断根片对便秘小鼠排便时间和粪便含水量的影响 模型对照组小鼠首粒黑便的出现时间比空白对照组明显延长($P<0.01$),5 h内的黑便粒数与粪便含水量明显降低($P<0.01$),表明洛派丁胺引起小鼠便秘。与模型对照组比较,阳性对照组、痔断根片高剂量组可以显著缩短首粒黑便出现的时间($P<0.05$ 或 $P<0.01$),增加5h内黑便粒数和粪便含水量($P<0.05$ 或 $P<0.01$),提示痔断根片有一定程度的通便、润肠作用,且高剂量痔断根片效果优于

乳果糖口服溶液,表3。

2.4 痔断根片对结肠黏膜组织 AQP1 mRNA 表达的影响 与空白对照组比较,模型对照组小鼠结肠黏膜组织 AQP4 mRNA 表达显著升高($P<0.01$),表明洛派丁胺可以通过调控 AQP1 表达引起小鼠便秘。与模型对照组比较,阳性对照组、痔断根片低剂量组、痔断根片中剂量组和痔断根片高剂量组均可下调 AQP1 表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且高剂量痔断根片调控 AQP1 的效果优于乳果糖口服溶液,表4。

2.5 痔断根片对止血及凝血时间的影响 连续3 d 给予小鼠不同剂量痔断根片后,与空白对照组比较,痔断根片高、中剂量组的小鼠止血时间和凝血时间明显缩短($P<0.05$),提示痔断根片有一定的止血作用,表5。

表1 痔断根片对小鼠耳肿胀的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	耳壳重量(mg)		肿胀程度 (mg)	肿胀抑制率 (%)
	左	右		
模型对照组	18.4±0.8	35.0±4.9	16.6±5.0	...
阳性对照组	18.5±0.7	31.6±1.4	13.2±1.5*	29.7
痔断根片低剂量组	18.6±0.9	35.6±1.1	17.0±1.4*	8.9
痔断根片中剂量组	18.5±0.8	34.8±1.3	16.3±1.1*	13.0
痔断根片高剂量组	17.9±0.8	27.8±2.6	9.9±2.3**.#	47.2

与模型对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与阳性对照组比较,* $P<0.05$

表2 痔断根片对小鼠疼痛的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	无扭体反应动物数(只)	给药后 15 min 内扭体反应次数	抑制率(%)
模型对照组	0	32.2±6.5	...
阳性对照组	1	23.6±5.7**	26.8
痔断根片低剂量组	0	29.4±5.0	8.56
痔断根片中剂量组	0	27.5±5.3*	14.6
痔断根片高剂量组	2	18.1±5.1**.#	43.7

与模型对照组比较* $P<0.05$,** $P<0.01$;与阳性对照组比较* $P<0.05$

表3 痔断根片对首粒黑便时间、5 h内黑便粒数和粪便含水量的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	首粒黑便时间(min)	5 h黑便粒数	粪便含水量
空白对照组	130.0±33.8	12.5±3.1	53.9±2.6
模型对照组	268.2±60.1**	2.0±0.9**	30.5±1.3**
阳性对照组	223.7±41.8*	5.7±1.8**	54.5±2.0**
痔断根片低剂量组	264.4±59.9	2.1±0.9	46.6±3.5
痔断根片中剂量组	243.6±41.7	3.4±0.84*	56.9±4.4
痔断根片高剂量组	183.2±44.1**	7.9±2.0**	59.3±2.7**

与空白对照组比较,** $P<0.05$;与模型对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

表4 痔断根片对结肠黏膜组织 AQP1 mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	AQP4 mRNA 相对表达量
空白对照组	1.00±0.06
模型对照组	12.20±0.05**
阳性对照组	1.91±0.06**
痔断根片低剂量组	8.35±0.07*
痔断根片中剂量组	5.76±0.09*
痔断根片高剂量组	1.24±0.05**

与空白对照组比较,** $P<0.05$;与模型对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

表5 痔断根片对小鼠止血时间及凝血时间的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	止血时间(s)	凝血时间(s)
空白对照组	294.5±30.6	145.3±22.8
痔断根片低剂量组	286.7±46.1	146.0±21.2
痔断根片中剂量组	270.9±33.3*	130.6±17.7*
痔断根片高剂量组	252.2±37.6*	111.2±21.8*

与空白对照组比较, *P<0.05

3 讨论

痔疮是一类多发病,严重地影响着人们的健康和生活质量^[6-7]。痔疮多为饮食不节,起居失慎,湿热内生,蕴结肠道,下注肛门或风伤肠络,热迫血下致^[8]。中医药治疗疾病的特点就是运用辨证论治,从多方面多角度改善患者的症状和体征,符合痔疮疾病发病原因和治疗原理^[9]。

南京中医药大学常熟附属医院肛肠科在临床治疗内痔常用的中药制剂基础上,研制出了痔断根片,旨在寻找到一种稳定、易用、有效、安全的促进肛瘘创面愈合的有效制剂,并在临床推广应用。痔断根片充分利用了药物功能的适当兼容性,能达到显著的治愈效果^[4-5]。痔断根片由槐米炭、当归、黄连、生地、黄芩、大黄、火麻仁等十余味中药组成,经煎煮浓缩,烘干后研末,压制成片。槐米炭药性阴寒沉降,善止痔血,配合黄连、生地、黄芩等能入血从而起到止血作用^[4,10-11]。当归和火麻仁可以起到润滑肠道、促进排便的作用,大黄素用于湿热导致的便秘症状,3类药合理配伍让痔断根片的效果十分突出^[12-14]。将大便软化、促进排便通畅,是治疗痔疮的重要手段^[15],而痔断根片恰能软化大便,使痔疮患者的症状有效消减。

本研究采用了小鼠各类病理模型,证实了痔断根片的抗炎、镇痛、止血及通便润肠功效,与先前报道的痔断根片治疗痔疮的治疗临床疗效取得一致^[4]。基于各类小鼠模型,本研究发现高剂量痔断根片的抗炎镇痛效果优于阿司匹林、润肠通便作用优于乳果糖。近年研究发现水通道蛋白异常表达与便秘存在显著相关性,而便秘极易引起痔疮反复发作^[16]。结肠黏膜组织中AQP1表达量升高往往导致黏膜吸收水分过度,从而造成粪便含水量急剧下降,诱发便秘^[17-18]。本研究发现痔断根片可有效降低AQP1表达,从而使粪便含水量升高达到促进排便作用,在一定程度上保存肠道内水分,这可能是痔断根片在临床应用上有效改善痔核脱出的原因之一。痔断根片能通过调控AQP1表达量改善小鼠排便情况,这提示痔断根片或许是便秘引起痔疮反复发作的有效预防用药。

本研究利用小鼠耳肿胀急性炎症模型、乙酸刺激构建的疼痛模型、洛派丁胺诱导的便秘模型、出

血及凝血模型,充分研究了痔断根片的药效,实验表明痔断根片具有抗炎、镇痛、通便润肠和止血功效,为痔断根片的深入开发和临床应用提供了扎实的基础。

【参考文献】

- [1] Liu T, Zhou H, Lu H, et al. MiR-4729 regulates TIE1 mRNA m6A modification and angiogenesis in hemorrhoids by targeting METTL14[J]. *Annals of Translational Medicine*, 2021, 9(3):232.
- [2] Yang PJ, LaMarca M, Kaminski C, et al. Hydrodynamics of defecation[J]. *Soft Matter*, 2017,13(29):4960-4970.
- [3] Sadeq AF, Al-Hamdani HA, Najee H. Efficacy and complication of rubber band ligation of hemorrhoids in out patient clinic in al-muthanna province[J]. *International Journal of Psychosocial Rehabilitation*, 2020, 24(5):443-447.
- [4] 赵平,季利江,顾志明,等.痔断根片治疗内痔的临床研究[J]. *中国肛肠病杂志*,2020,40(11):34-36.
- [5] 顾志明.痔断根片治疗I、II期内痔50例临床观察[J]. *云南中医药杂志*,2011,32(9):20-21.
- [6] Abid H, Ousseur G, Benjira R, et al. The elastic ligation of internal hemorrhoids: where are we now?[J]. *Open Journal of Gastroenterology*, 2019, 9(1):28-35.
- [7] 李梦丽,宋红旗.痔疮的临床治疗研究进展[J]. *中国民间疗法*, 2020,28(03):88-89.
- [8] 张淑臻.中医药疗法治疗痔疮的效果观察及其护理对策[J]. *中医临床研究*,2020,12(23):115-117.
- [9] 陈凯迪,严建.参茸槐榆汤治疗痔疮患者的临床疗效及对中医证候的影响[J]. *中国药物经济学*,2021,16(5):95-99.
- [10] 廖乃忠.槐角地榆汤防治痔疮术后出血疗效观察[J]. *临床医药文献电子杂志*,2020,7(1):48-49.
- [11] 顾菁华,杜培欣,吴伟,等.黄连解毒汤对急性痔疮模型大鼠肛周病理组织形态、免疫功能以及炎症因子的影响[J]. *中国中医急症*,2020,29(1):25-28.
- [12] Jang GW, Yu EJ, Choi SI, et al. Comparison of oxidative stability between flax seed oil and hemp seed Oil[J]. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 2020, 49(7):768-773.
- [13] Liu M, Xu R. Complete chloroplast genome sequence of an alpine rhubarb *Rheum likiangense*[J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 2020, 5(3):3681-3682.
- [14] 叶佳慧,张悦,黄梦婷,等.抗炎活性单方中草药的免疫活性研究现状[J]. *海峡药学*,2021,33(2):40-45.
- [15] Regadas, F. S. P., Regadas Filho, F. S. P. Staplers for obstructed defecation syndrome[J]. *Techniques in coloproctology*, 2018, 22(1):1-3.
- [16] Jacobs DO. Hemorrhoids: what are the options in 2018? [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2018, 34(1):46-49.
- [17] Cao Y, He Y, Wei C, et al. Aquaporins alteration profiles revealed different actions of senna, sennosides, and sennoside a in diarrhea-rats[J]. *Int J Mol*, 2018, 19(10):3210.
- [18] Camilleri M, Carlson P, Chedid V, et al. Aquaporin expression in colonic mucosal biopsies from irritable bowel syndrome with diarrhea[J]. *Clin Transl Gastroenterol*. 2019,10(4):e00019.