

田茂生,高记华,戚文月,等. 贻贝粘蛋白对痔病大鼠模型治疗作用的实验研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 742-750.

Tian MS, Gao JH, Qi WY, et al. Therapeutic effect of mussel adhesive protein on hemorrhoids disease in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 742-750.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.06.002

贻贝粘蛋白对痔病大鼠模型治疗作用的实验研究

田茂生^{1,3,4},高记华^{2,3*},戚文月^{1,3},刘朝阳^{1,3},吴琳琳^{1,3},高策^{2,3},顾铭⁵,
康瑞娟⁵,李利霞^{2,3}

(1. 河北中医学院,石家庄 050091;2. 河北中医学院第一附属医院,石家庄 050011;3. 河北省中西医结合胃肠病研究重点实验室,石家庄 050011;4. 山西省人民医院,太原 030002;5. 中国科学院过程工程研究所,北京 100190)

【摘要】 目的 本研究基于直肠局部用药要求建立巴豆油诱导的痔病大鼠模型,探究贻贝粘蛋白(MAP)的抗痔疗效和黏附性,并探讨其作用机制。**方法** 以巴豆油为致炎剂建立痔病大鼠模型,将40只SPF级SD大鼠按体重随机分为4组,造模后1h各组大鼠予以相应治疗。D4取材,处死前30min将1%伊文思蓝(EBD)注入大鼠尾静脉,计算肛肠系数,评价血管通透性,Western Blot法检测黏蛋白Muc2、Muc4的蛋白相对表达量,ELISA法检测大鼠血清TNF- α 、IL-6、MDA表达量。通过在体实验和离体实验比较异硫氰酸荧光素(FITC)标记的MAP在大鼠直肠的荧光成像,观察比较MAP在直肠的黏附性。**结果** MAP可减少大鼠肛门直肠肿胀、分泌物和渗出情况,肛肠系数结果提示MAP可降低肛门直肠肿胀程度($P < 0.01$),EBD含量提示MAP可降低局部血管通透性($P < 0.01$),增加黏蛋白Muc2、Muc4的相对表达量($P < 0.05$),降低血清TNF- α 、IL-6、MDA表达量($P < 0.01$),荧光成像结果显示MAP在直肠环境内表现出良好的黏附性和稳定性。**结论** 海洋生物材料贻贝粘蛋白具有良好黏附性,能够减轻大鼠肛门直肠黏膜肿胀、增加黏膜黏蛋白表达、抑制炎症、修复黏膜屏障、促进黏膜愈合、改善痔病大鼠模型症状,可为痔病药物的临床前研究提供可靠依据。

【关键词】 痔病;巴豆油模型;贻贝粘蛋白;黏膜屏障;黏附性

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)06-0742-09

Therapeutic effect of mussel adhesive protein on hemorrhoids disease in rats

TIAN Maosheng^{1,3,4}, GAO Jihua^{2,3*}, QI Wenyue^{1,3}, LIU Zhaoyang^{1,3}, WU Linlin^{1,3}, GAO Ce^{2,3},
GU Ming⁵, KANG Ruijuan⁵, LI Lixia^{2,3}

(1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China. 2. the First Affiliated Hospital of Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011. 3. Key Laboratory of Gastroenterology Research of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine of Hebei Province, Shijiazhuang 050011. 4. Shanxi Provincial People's Hospital, Taiyuan 030002. 5. Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190)

Corresponding author: GAO Jihua. E-mail: gaojihua2005@163.com

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(82174381),国家重点研发计划项目(2016YFC1103200),中国博士后科学基金项目(2021M701035),河北中医学院科研能力提升重点项目(KTZ2019033),河北中医学院研究生创新能力培养资助项目(XCXZZBS2021019)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(82174381), National Key Research and Development Program of China(2016YFC1103200), China Postdoctoral Science Foundation Project(2021M701035), Key Project of Research Capacity Improvement of Hebei University of Chinese Medicine(KTZ2019033), Project of Postgraduate Creativity Training Foundation of Hebei University of Chinese Medicine(XCXZZBS2021019).

【作者简介】 田茂生(1988—),男,博士,主治医师,研究方向:中医药防治结直肠肛门及盆底疾病。Email: t-ms1988@163.com

【通信作者】 高记华(1964—),男,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:中医药防治结直肠肛门及盆底疾病。Email: gaojihua2005@163.com

【Abstract】 Objective The anti-hemorrhoid efficacy and adhesion of mussel adhesive protein (MAP) was studied and its mechanism evaluated. **Methods** Croton oil was used to stimulate the anorectal mucosa to establish the model. Forty specific-pathogen-free grade Sprague-Dawley rats were divided into four experimental groups. One hour after model creation, different treatments were applied to each group by rectal administration under anesthesia. General observation was performed on the fourth day. A 1% solution of EBD was injected into the tail vein 30 min before rats were sacrificed. Approximately 8 mm of rectum was cut off and weighed to calculate the anorectal coefficient. Vascular permeability was evaluated by measuring EBD concentrations. Western Blot was used to detect relative protein expression levels of Muc2 and Muc4, and ELISA was used to detect expression of serum tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin (IL-6), and malonaldehyde (MDA) in rats. Fluorescence imaging of FITC-labeled MAP at different times was compared and observed by fluorescence microscopy. **Results** General observations revealed that MAP could reduce the redness, edema, mucosal secretion, and exudation in the rectal area of rats. Anorectal coefficient result suggested that MAP could reduce the degree of rectal swelling ($P < 0.01$), and EBD contents suggested that MAP could reduce local vascular permeability ($P < 0.01$). Relative expression levels of mucins Muc2 and Muc4 were increased ($P < 0.05$), whereas expression levels of serum TNF- α , IL-6, and MDA were decreased ($P < 0.01$). Fluorescence imaging indicated that FITC-MAP could maintain good adhesion and stability in the rectum. **Conclusions** MAP could increase the expression of mucosal mucin, inhibit inflammation, repair the mucosal barrier, promote mucosal healing, and improve the symptoms of hemorrhoids in a rat model, which can provide a reliable basis for preclinical research of hemorrhoids drugs.

【Keywords】 hemorrhoids disease; croton oil induced model; mussel adhesive protein; mucosal barrier; adhesion
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

痔病是一种常见的肛肠疾病,是直肠肛垫组织的异常病理性肥大、移位^[1-2],痔组织的肿胀脱垂、出血、疼痛、炎性刺激、排便困难等是痔病常见的临床症状,肛肠疾病患者中合并痔病症状的占比可达 98.09%^[3-5]。痔病治疗原则是治疗有症状的痔^[3-6],由于该病的特殊性和高病发率,直肠局部用药成为 I、II 度痔病患者的最佳治疗方式,同时也给直肠局部抗痔药物的药效学研究带来了更多的挑战^[7-12]。目前痔病仍然没有绝对有效的药物治法,这是由于痔病症状是缓慢出现且是多因素的,涉及到肛垫微循环调节障碍、肛垫悬吊组织退行性病变等原因。

海洋生物贻贝的足丝腺分泌物提取的大分子蛋白——贻贝粘蛋白(MAP),已在临床中证明具有局部抗炎和促进愈合的作用^[13-14]。一项针对体外生物活性研究的双盲对照临床试验显示,MAP 能够减少促炎因子(IL-1 α , IL-6, COX-2)表达,保护 HaCaT 细胞免受 UVB 诱导的细胞死亡和凋亡^[15]。随着生物材料技术的发展,海洋生物贻贝的足丝腺经粉碎、提取、色谱纯化、浓缩等制备工艺,可得到高纯度的生物大分子蛋白,进一步加工合成新型凝胶制剂贻贝粘蛋白肛肠敷料^[16]。本研究基于直肠局部用药要求建立巴豆油诱导的痔病大鼠模型,探究贻贝粘蛋白(MAP)的抗痔疗效和黏附性,并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

68 只 6 ~ 8 周龄的 SPF 级 SD 大鼠,体重 180 ~ 220 g,雌雄各半,由浙江维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(浙)2020-0002】。进行实验期间,大鼠被饲养于菲诺克生物科技(上海)有限公司屏障设施实验室【SYXK(沪)2018-0023】,温度(22 $\pm$ 2)℃,湿度 40% ~ 70%,12 h 交替昼夜灯光,以标准的实验室饲料、正常饮用水喂养 1 周,实验前 12 h 禁食但不禁水。所有实验方案均经菲诺克生物科技实验动物福利伦理审查委员会批准(phenotek-sh008)。

1.1.2 主要试剂与仪器

吡啶(C10376055,上海麦克林生化技术有限公司),巴豆油(KD2HE-FH,东京化工股份有限公司),橄榄油(K1809057,上海阿拉丁生化技术有限公司),甲酰胺(C10541284,上海麦克林生化技术有限公司),伊文斯蓝染料(EBD,C10325619,上海麦克林生化技术有限公司),异硫氰酸荧光素(FITC,C11189816,上海麦克林生化技术有限公司),2% 异氟烷(2017171101,深圳瑞沃德生命技术有限公司),复方醋酸地塞米松乳膏(1905001X,华润三九制药有限公司),贻贝粘蛋白肛肠敷料(MAP,江阴

贝瑞森生化技术有限公司), 蛋白提取液 (MDL91201, MDL), 蛋白酶抑制剂 (MD912893, MDL), 中等蛋白分子量 marker (ThermoFisher Scientific), 重组 Anti-actin 抗体 (MD6553, MDL), 二抗 (MD912565, MDL), 重组 Anti-MUC2 抗体 (ab133555, Abcam), 重组 Anti-MUC4 抗体 (ab194363, Abcam)。

多通道动物麻醉系统 (深圳瑞沃德生命技术有限公司, 中国), FA-N 电子天平 (上海力辰邦西仪器科技有限公司, 中国), Q24 型组织破碎匀浆仪 (鼎昊源科技有限公司, 中国), SH-1000Lab 全波长酶标仪 (株式会社日立制造所, 日本), D3024R 台式高速冷冻型离心机 (大龙兴创实验仪器有限公司, 中国), Leica ASP300S 型全自动脱水机 (LEICA 公司, 德国), Leica RM2245 型半自动切片机 (LEICA 公司, 中国), Leica TS5015 型全自动染色机 (LEICA 公司, 德国), Olympus BX45 型光学显微镜 (Olympus 公司, 日本), DP72 型图像分析系统 (Olympus 公司, 日本), MZX81 立体荧光显微镜 (广州明美光电技术有限公司, 中国), 超低温冷冻存储箱 (长虹美菱有限公司, 中国), PVDF 膜 (ISEQ00010, Millipore, 美国), 3 MM 滤纸 (3030861, Whatman, 英国), TS-100 脱色摇床 (海门其林贝尔仪器制造公司), 电泳仪 (BG-subMIDI, 北京百晶生物技术有限公司), SDS-PAGE 电泳系统 (Bio-Rad, 美国), 凝胶成像系统 (GelDoc-It310, UVP, 美国), 化学发光成像系统 (ChemiScope6100, 上海勤翔科学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 MAP 对痔病模型的药效学实验

(1) 分组: 将 40 只 SPF 级 SD 大鼠按体重随机分为 4 组, 每组 10 只, 分别为对照组、模型组、地米组和贻贝组。

(2) 造模和给药: 在前期研究基础上采用优化方案造模^[12], 取直径合适的棉签浸泡于 6% 巴豆油混合液, 缓慢置入大鼠肛门直肠至合适的深度后停留 10 s, 抽出棉签均匀涂在肛周皮肤。对照组用橄榄油替代巴豆油。造模后 1 h, 每组大鼠经肛门直肠进行局部治疗, 疗程每天 1 次, 连续 3 d, 治疗时动物吸入 2% 异氟烷维持麻醉状态 2 h。对照组未接受治疗, 模型组给予空白凝胶基质, DXM 组给予复方醋酸地塞米松乳膏, MAP 组给予贻贝粘蛋白肛肠敷料。给药时采用 1 mL 去针头注射器, 将注射器插入大鼠肛门直

肠至 10 mm, 注射推注药物每只 200 μ L。

(3) 实验取材: 造模后 D4 解剖取材, 处死前 30 min 将 1% 的 EBD (2 mL/kg) 注入大鼠尾静脉。按优化方案取材, 取材前动物吸入过量 CO₂ 安乐处死, 处死后由同一操作者截取 8 mm 直肠作为标本, 部分标本取材迅速置于液氮中保存 3 h, 再移至 -80℃ 低温冰箱保存备用。眼眶取血约 1.5 mL, 保存至无菌采血管, 室温血液自然凝固 30 min, 4℃ 条件离心 10 min 左右 (3000 r/min), 仔细收集上清, 置于 -80℃ 低温冰箱保存备用。

(4) 大体观察: D4 各组大鼠称重, 观察粪便情况, 肛周皮肤及肛门直肠黏膜有无水肿、黏液、分泌物渗出情况。

(5) 黏膜肿胀抑制率: 采用 Image J 软件分析各组标本的照片, 测算 EBD 染色肿胀范围的面积, 分析比较各组肿胀情况, 肿胀抑制率 (%) = (对照组肿胀面积 - 实验组肿胀面积) / 对照组肿胀面积 $\times 100\%$ 。

(6) 肛肠系数: 按标准取材后对每组动物标本进行湿重称重, 计算肛肠系数, 肛肠系数 (%) = 标本湿重 / 动物体重 $\times 100\%$ 。

(7) 血管通透性的定量检测: 根据文献检测血管通透性的方法^[17-18], 标本置于含有甲酰胺 (1 mL/100 mg) 的试管中, 在 55℃ 的水浴中孵育 24 h, 在室温下离心 15 min (5000 r/min), 收集上清液。酶标仪测定 620 nm 处吸光度, 计算组织中 EBD 渗出量, 定量评估血管通透性。

(8) Western Blot 检测: 蛋白提取, 组织加液氮进行匀浆, 4℃, 12 000 rpm, 15 min 离心, 收集上清; BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度, 将各个标准品和待测样品在 562 nm 处的吸光值减去空白标准品的平均吸光值。制备 SDS-PAGE 凝胶, 配制 5% 浓缩胶 4 mL, 凝胶板重新垂直放置, 插入样品梳, 玻璃夹板“凹”面贴紧电泳槽, 两侧用夹子固定电泳槽。加入总蛋白样品与蛋白质凝胶电泳上样缓冲液混合, 95℃ 变性 10 min, 电泳使染料至分离胶适当位置, 将蛋白条带通过转移电泳方式转印至 PVDF 膜。转膜时将样品胶与膜装入转膜夹板中, 放入含有转膜缓冲液的转移电泳槽中, 恒压状态下转膜 2 h。抗体孵育: 封闭: 小心取出转移膜置于封闭液中, 室温、摇床上缓慢摇动状态下封闭 1 h; 一抗反应: 将一抗用封闭液稀释; 将封闭后的膜分别加入对应的一抗工作液中, 4℃ 反应过夜。洗膜: 将反应膜放入平皿中,

用 $1 \times$ TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,洗净未结合的一抗;二抗反应:将二抗用 1 菌素 $\times$ TBST 稀释 300 倍;将洗涤后的一抗反应膜放入二抗工作液中作用 60 min;洗膜:用 $1 \times$ TBST 洗膜,洗去游离二抗。按 1:1(v/v)混合 ECL 试剂盒中两种液体,将混合液均匀铺在 PVDF 膜表面,室温作用 4 min,抖掉膜上液体,放入成像系统成像,软件分析蛋白条带灰度值,计算样本组织蛋白相对含量。

(9)酶联免疫法检测:通过 ELISA 法检测血清 TNF- α 、IL-6、MDA 的表达含量,严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.2.2 MAP 肠道黏附性的实验

制备 FITC-MAP 溶液,MAP 与 FITC 按 100:1 比例混合,4℃ 反应 24 h,避光保存待用。取 28 只 SPF 级 SD 大鼠按体重随机分为 3 组,分别为在体组 12 只,离体组 12 只,对照组 4 只。在体组大鼠以 2% 异氟烷吸入诱导麻醉,每只大鼠灌肠予以 FITC-MAP 溶液(1 mg/mL,每只 1 mL),燕尾夹关闭肛门,分别于灌肠后 2、4、8、24 h 处死解剖取材,截取 4 cm 直肠作为标本,完成荧光成像观察。离体组大鼠麻醉后解剖,取直肠 8 cm,剥离周围脂肪及内容物,生理盐水冲洗后置入加湿的培养皿,取 4 cm 肠段处作

标记,远端燕尾夹关闭肛门,近端灌注 FITC-MAP 溶液(1 mg/mL,每只 1 mL),标记处结扎,分别于灌注后 0、0.5、1、2 h 取标记段直肠为标本,完成荧光成像观察。对照组大鼠未进行任何干预,方法同前,取材后 0 h 对标本荧光成像观察。

1.3 统计学分析

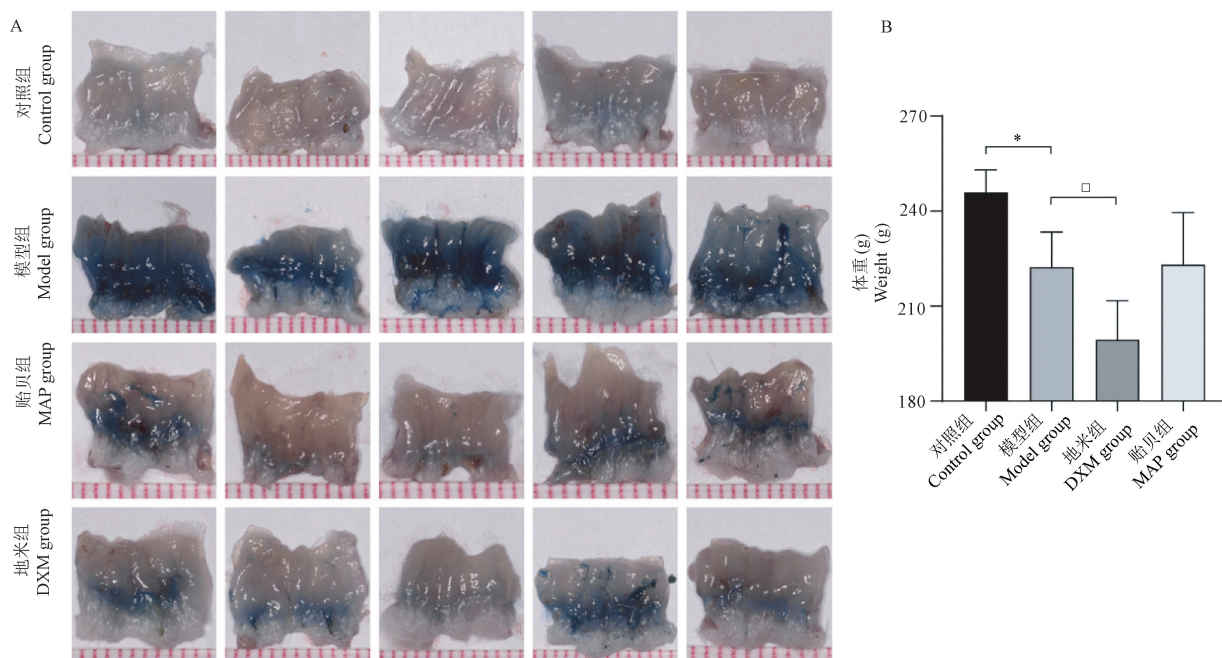
采用 SPSS 25.0 软件和 GraphPad Prism 8.0 软件对实验数据进行统计分析。测量数据均以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行正态性检验,组间比较采用单因素方差分析或非参数检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 MAP 对大鼠痔病模型的药效学实验结果

2.1.1 大体形态观察结果

各组动物取材后拍照记录,如图 1A 所示,观察肛肠黏膜可见痔病模型大鼠的肛周皮肤及直肠黏膜呈现不同程度的肛周肿胀、黏膜水肿、黏液分泌和血性渗出物。地米组大鼠体重明显减少,较其他实验组差异具有显著性(图 1B, $P < 0.05$),其他组体重无统计学差异。提示地米组和贻贝组病灶区域的病变程度均低于模型组,说明 MAP 可减轻肛门



注:A:各组肛门直肠黏膜大体形态观察;B:各组体重比较;与对照组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,□ $P < 0.05$ 。(下同)

图1 大体形态观察结果

Note. A. Observation of the gross morphology of anorectal mucosa in each group. B. Weight comparison of each group. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, □ $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 1 Observation on gross morphology

直肠黏膜肿胀,促进损伤黏膜愈合,但 DXM 可引起体重下降。

2.1.2 黏膜肿胀抑制率结果

通过 Image J 软件分析标本照片,测算标本 EBD 染色肿胀范围的面积,结果可知地米组和贻贝组黏膜肿胀范围较对照组明显减少,差异具有显著性(图 2A, $P < 0.01$),地米组肿胀抑制率 53.09%,贻贝组肿胀抑制率 36.08%,表明工具药 DXM 与 MAP 均能一定程度缓解巴豆油诱导的大鼠肛门直肠黏膜肿胀。

2.1.3 肛肠系数结果

各组肛肠系数的结果见图 2B 所示,与对照组比,模型组的肛肠系数明显增大($P < 0.01$),表明模型组的肛门直肠黏膜的组织密度增加,黏膜水肿充血程度增加。与模型组比,地米组的肛肠系数显著降低($P < 0.05$),表明地米组的肛门直肠黏膜的组

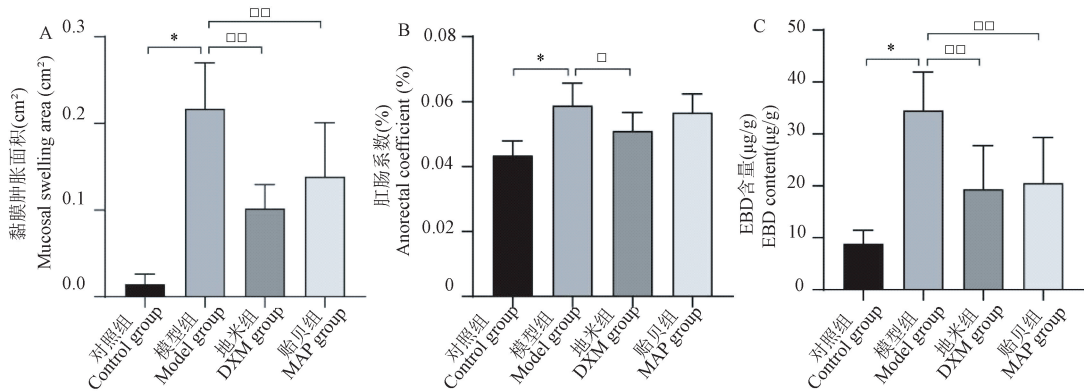
织密度降低,黏膜水肿充血程度降低,即动物模型差异具有显著性,模型建立成功。贻贝组的肛肠系数低于模型组,肛门直肠黏膜的水肿充血程度降低,说明 MAP 可一定程度上缓解模型病变。

2.1.4 血管通透性的定量检测结果

通过对各组 EBD 含量定量检测结果显示(图 2C),地米组和贻贝组的 EBD 含量均显著低于模型组($P < 0.01$),这说明经肛门直肠局部外用 DXM 和 MAP 能显著降低模型病灶组织局部的血管通透性,且 MAP 的效力与 DXM 相当。

2.1.5 Western Blot 检测结果

Western Blot 显示,与对照组相比,模型组蛋白相对表达量差异具有显著性,与模型组相比,贻贝组、地米组蛋白相对表达量差异具有显著性(图 3, $P < 0.05$),表明痔病模型大鼠局部治疗后,增加了黏蛋白 Muc2、Muc4 的相对表达量。

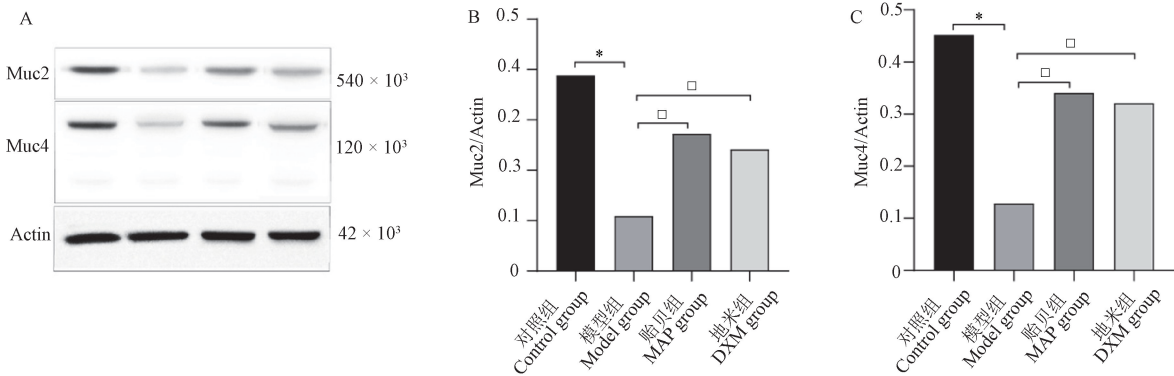


注:A:黏膜肿胀面积的比较;B:肛肠系数的比较;C:伊文思蓝含量的比较;与模型组相比,□□ $P < 0.01$ 。(下同)

图2 各组数据比较结果

Note. A. Comparison of mucosal swelling area. B. Comparison of anorectal coefficient. C. Comparison of EBD content. Compared with model group, □□ $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Comparison results of each group of data



注:A:Muc2、Muc4 的表达;B:Muc2 的相对表达量;C:Muc4 的相对表达量。

图3 各组 Muc 2、Muc 4 蛋白相对表达量的比较

Note. A. The expression of Muc2 and Muc4. B. The relative expression of Muc2. C. The relative expression of Muc4.

Figure 3 Comparison of relative expression levels of Muc2 and Muc4 proteins in each group

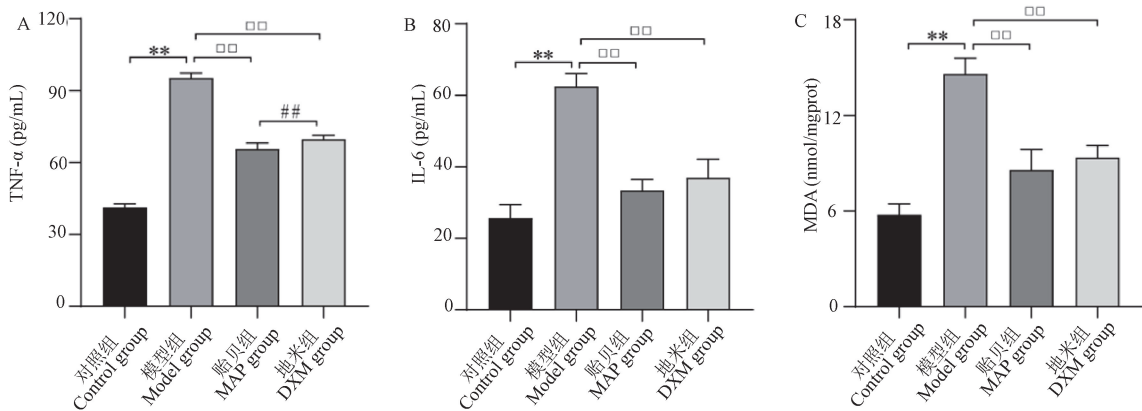
2.1.6 酶联免疫法检测检测结果

ELISA 的检测结果显示,痔病模型模型组血清 TNF-α、IL-6、MDA 表达量与对照组比差异具有显著性(图 4, $P < 0.01$),模型组高于对照组,局部药物干预后与模型组相比,贻贝、地米组表达量下降,差异具有显著性(图 4, $P < 0.01$),且与贻贝组相比,地米组 TNF-α 表达量差异具有显著性(图 4, $P < 0.01$)。

2.2 MAP 肠道黏附性的评价结果

通过荧光显微镜观察 FITC-MAP 溶液灌注于大鼠直肠腔内的情况,并获取不同时间点在体和

离体大鼠直肠组织的荧光成像图像。FITC-MAP 溶液在荧光显微镜下显示为绿色,可作为 MAP 在直肠黏膜的黏附性和降解趋势的参考。在体组可见大鼠直肠的绿色荧光成像与时间呈正相关,提示 MAP 在大鼠肠腔环境内能保持良好的黏附性,且经肛门直肠用药后与直肠黏膜的作用时间可达 24 h(图 5)。离体组大鼠的直肠组织荧光成像结果显示,MAP 在离体直肠中也具有良好的稳定性。但是,对照组大鼠的直肠组织荧光成像几乎找不到荧光颜色(图 6)。



注:A:血清 TNF-α 表达量;B:血清 IL-6 表达量;C:血清 MDA 表达量;与对照组相比, ** $P < 0.01$;与贻贝组相比, ## $P < 0.01$ 。
图 4 各组血清 TNF-α、IL-6、MDA 表达量的比较
Note. A. The expression of TNF-α. B. The expression of IL-6. C. The expression of MDA. Compared with the control group, ** $P < 0.01$. Compared with the MAP group, ## $P < 0.01$.

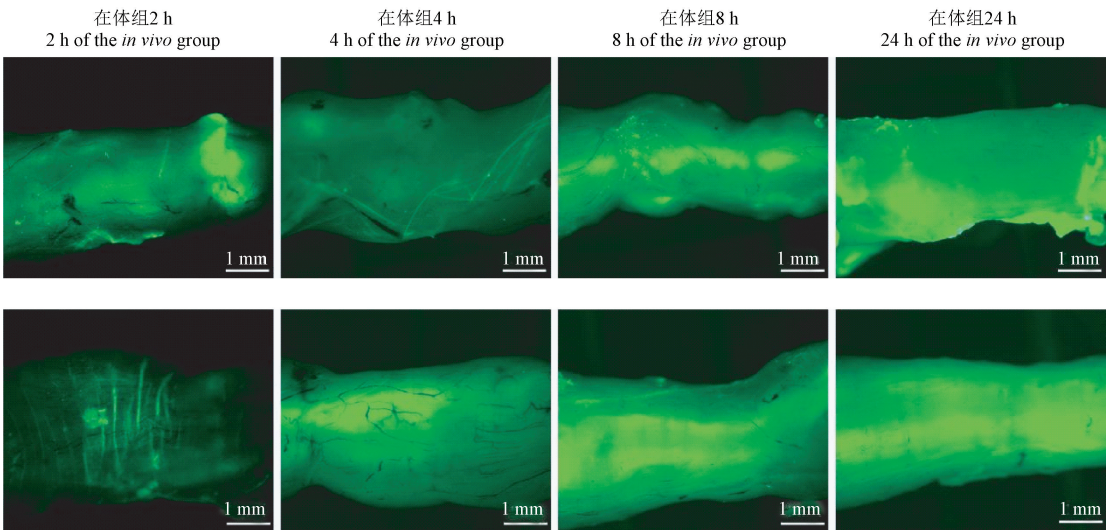


图 5 在体组荧光成像
Figure 5 Fluorescence imaging in the *in vivo* group

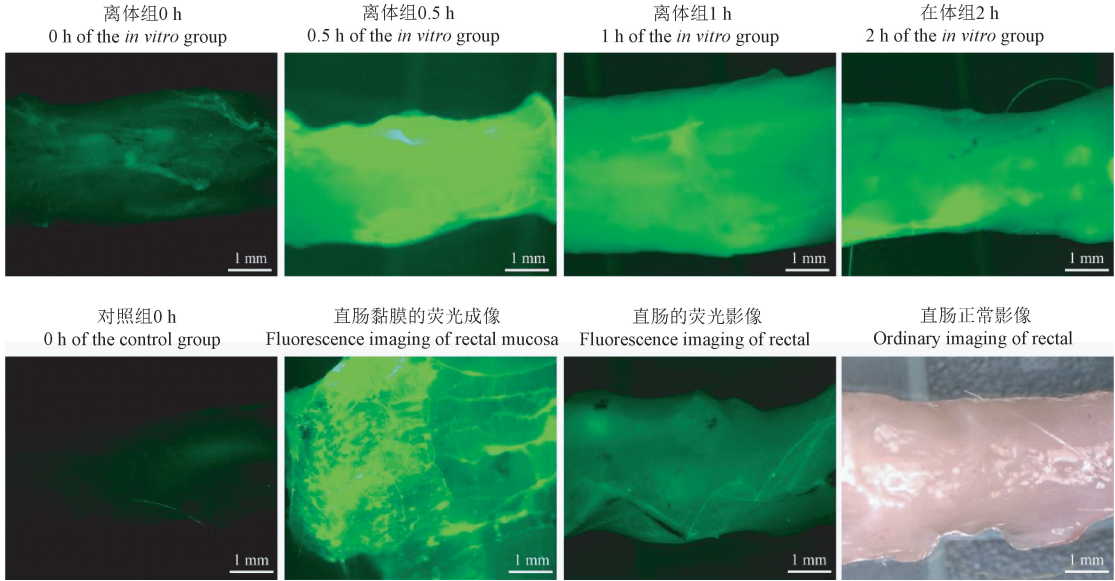


图 6 离体组和对照组的荧光成像
Figure 6 Fluorescence imaging in the *in vitro* group and control group

3 讨论

痔病的症状多表现为肛垫的充血、肿胀、糜烂、出血、分泌物增多等现象,痔病发生部位即肛垫黏膜区,黏膜上皮是包含多种功能的上皮细胞复合体,黏膜表层有大量分泌功能的黏液分泌细胞,如杯状细胞、柱状细胞等,可分泌黏蛋白、黏多糖、糖原等防御功能物质,共同构成黏液屏障,黏附有害物质,阻止微生物入侵。肛垫黏膜的细胞结构决定了其不仅有重要防御功能,当致病因子突破肛垫黏膜屏障时会引起局部组织的神经激素内分泌调节障碍,痔血管出现扩张,毛细血管的通透性增加,肛垫黏膜水肿、充血、损伤,局部感染出现炎症,导致症状性痔出现。因此,肛垫黏膜屏障功能的完整与修护在痔病的防治中具有重要意义。

本研究采取巴豆油刺激大鼠肛门直肠黏膜产生炎症反应诱导大鼠痔病模型^[19],损伤局部毛细血管壁,破坏血管内皮屏障,增加血管通透性,引起组织损伤血浆渗出,这一过程降低了血浆胶体渗透压,促进更多组织液滤出毛细血管,累积于间质间隙,发生组织水肿、黏膜充血,由此模型大鼠的肛门直肠黏膜组织呈明显肿胀^[20]。因此,定量评估血管通透性的变化是该实验模型的关键。Azeemuddin 等^[19]报道了一种利用 EBD 外渗技术定量检测血管通透性的方法^[21],于巴豆油造模前 30 min 尾静脉注射 EBD,灌胃给药 5 d 后处死动物,再评价组织中 EBD 含量。笔者对 EBD 的使用方法进行优化,选择

治疗 3 d 后动物处死前 30 min 尾静脉注射 EBD。定量检测结果更直接反映不同疗法对动物血管通透性变化的影响,同时规避造模及给药操作等人为因素对 EBD 渗出的干扰,保障实验数据精准,为模型评价提供精确定量指标。局部给药时采取 2% 异氟烷吸入诱导麻醉,使动物维持一定时间麻醉静息状态,确保药物制剂经肛门直肠用药后在体内的有效及起效时间,降低排便频率差异对疗效评价的影响。目前还没有公认的阳性药物用于评价该模型的建立,巴豆油诱导的大鼠痔病模型具有炎症性模型特征,因此以经典抗炎药物 DXM 为工具药,用于评价模型建立^[22]。实验发现连续应用 DXM 可引发大鼠体重明显下降,尽管其能够降低局部血管通透性,抗炎疗效明显,但糖皮质激素药物存在一定安全性问题,不适合长期应用。

脏器系数又称脏体比,是某器官的重量与体重的重量之比,脏器系数的增加表明该器官可能发生充血、水肿、增生肥大等病变^[18]。在这项研究中,肛门直肠组织不是一个完整的器官,而是直肠末端的一部分,截取标本时操作误差可能对肛肠系数的精度产生一定影响,半定量评价指标肛肠系数可从一定程度反映疗效。黏膜上皮细胞分泌的黏液主要来自杯状细胞等分泌细胞,对维持黏膜屏障功能有重要作用,形成黏液的主要蛋白是 Muc2、Muc4^[23-24],属于分泌型黏蛋白,能够促进上皮细胞的受损部位愈合,促进黏膜修复。机体内自由基作用于脂质发生过氧化反应,氧化终产物为 MDA,其

含量反映的是机体抗氧化潜在能力的重要参数,可以反映机体脂质过氧化速率和强度,间接反映组织过氧化损伤程度。

MAP 是一种基于海洋生物贻贝足丝腺黏附机制开发的仿生生物材料,已广泛应用外科、妇产科、烧伤整形科、皮肤科、激光美容等多个领域^[13-14],表现出良好的局部抗炎和促进愈合功效^[15,25]。本实验评价了 MAP 对痔病大鼠模型的治疗效果及黏膜的修复情况,经大体观察、肛肠系数、血管通透性比较、Western Blot、ELISA 法检测发现 MAP 在复杂的直肠环境中可保持长期黏附,不受排便等因素影响,保证了 MAP 与肛肠黏膜有效接触面积和起效时间,局部外用可造成大鼠直肠黏膜中黏蛋白 Muc2 和 Muc4 蛋白相对表达量增加,炎症因子 TNF- α 、IL-6,黏膜修复相关因子 MDA 的表达量下降,MAP、DXM 均可一定程度改善模型大鼠的病变,缓解肛周肿胀、黏膜水肿充血,促进黏膜创面愈合。MAP 具有生物黏附剂给药系统的相似特性^[26],在不稳定的直肠环境中发挥优势。MAP 含有 20% 的赖氨酸,使蛋白质具有较高的正电荷,并通过静电作用与细胞紧密快速结合。MAP 中含有的 3,4 二羟基苯丙氨酸(DOPA)可被氧化生成邻二醌,与未氧化的多巴交联形成网状生物支架,促进细胞黏附和爬行,促进直肠黏膜组织再生和修复。交联的 MAP 可通过静电相互作用与覆盖在肠上皮细胞表面的黏蛋白结合^[27],黏蛋白、黏多糖是具有重要防御功能的物质,形成直肠黏膜屏障功能,可有效阻止微生物、微粒和大分子入侵。黏蛋白由高分子量丝状糖蛋白组成,与 MAP 的化学结构和功能上有相似之处,MAP 可以取代受损黏蛋白修复结直肠上皮细胞,恢复细胞间的紧密连接^[28],恢复直肠黏膜屏障功能的完整性,减少对黏膜上皮细胞的持续炎症刺激^[29]。MAP 具有较强的抗氧化能力^[30],可保护组织免受内部氧化应激的损伤,通过与硫化氢反应,保护黏蛋白的二硫键不被破坏,维持和恢复黏液层的完整性,中和各种氧自由基,起到抗炎修复作用。

综上所述,本研究评价了 MAP 对大鼠痔病模型肛周直肠黏膜肿胀的治疗效果,研究结果表明,MAP 能够减轻大鼠肛周直肠黏膜肿胀、增加黏膜黏蛋白表达、抑制炎症、修复黏膜屏障、促进黏膜愈合、改善痔病大鼠模型症状,同时证实其在直肠复杂环境中的良好黏附性,为痔病药物的临床前药理药效研究提供可靠方法。

参 考 文 献 (References)

- [1] Thomson WH. The nature of haemorrhoids [J]. Brit J Surg, 2010, 62(7): 542-552.
- [2] Thomson WH. The nature and cause of haemorrhoids [J]. Proc R Soc Med, 1975, 68(9): 574-575.
- [3] Gallo G, Martellucci J, Sturiale A, et al. Consensus statement of the Italian society of colorectal surgery (SICCR): management and treatment of hemorrhoidal disease [J]. Tech Coloproctol, 2020, 24(2): 145-164.
- [4] Yamana T. Japanese practice guidelines for anal disorders I. hemorrhoids [J]. J Anus Rectum Colon, 2017, 1(3): 89-99.
- [5] 范干一, 田茂生. 痔上黏膜套扎术加外痔切除术治疗重度混合痔临床疗效观察 [J]. 中国药物与临床, 2020, 20(17): 2880-2881.
Fan GY, Tian MS. Clinical effect of hemorrhoidal mucosal ligation combined with external hemorrhoidectomy for severe mixed hemorrhoids [J]. Chin Reme Clin, 2020, 20(17): 2880-2881.
- [6] Davis BR, Lee-Kong SA, Migaly J, et al. The American society of colon and rectal surgeons clinical practice guidelines for the management of hemorrhoids [J]. Dis Colon Rectum, 2018, 61(3): 284-292.
- [7] Hua S. Physiological and pharmaceutical considerations for rectal drug formulations [J]. Front Pharmacol, 2019, 13(10): 1196.
- [8] 钱伯初, 史红, 郑晓亮. 痔疮动物模型制作方法研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(2): 119-122.
Qian BC, Shi H, Zheng XL. Progress in preparation methodology of animal models of hemorrhoids [J]. Chin J Comp Med, 2007, 17(2): 119-122.
- [9] 刘朝阳, 吴琳琳, 田茂生, 等. 贻贝粘蛋白粘附性及抗氧化作用对大鼠溃疡性结肠炎的实验研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 570-577.
Liu ZY, Wu LL, Tian MS, et al. Experimental study on the adhesion and antioxidant effect of MAP on ulcerative colitis in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 570-577.
- [10] 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.
Ma ZG, Jiang N, Yu MY, et al. Research progress of animal models of hemorrhoids [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2010, 18(5): 446-450.
- [11] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会. 中药痔疮动物模型制备规范(草案) [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(5): 211-212.
Chinese Medicine Association of Chinese Medicine Experimental Pharmacology Professional Committee. Preparation specification for animal model of traditional Chinese medicine hemorrhoids (Draft) [J]. Pharm Clin Chin Med, 2017, 33(5): 211-212.
- [12] 田茂生, 戚文月, 刘朝阳, 等. 痔病相似症状定量评估模型的实验研究 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(10): 5237-5240.
Tian MS, Qi WY, Liu ZY, et al. Experimental study on quantitative evaluation model of similar symptoms of hemorrhoids [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(10): 5237-5240.
- [13] 高敏, 张长虹, 周俊, 等. 贻贝粘蛋白综述 [J]. 安徽农业科

- 学, 2011, 39(32): 19860–19862.
- Gao M, Zhang CH, Zhou J, et al. Overview of mussel adhesive protein [J]. J Anhui Agri Sci, 2011, 39(32): 19860–19862.
- [14] Lee BP, Messersmith PB, Israelachvili JN, et al. Mussel-inspired adhesives and coatings [J]. Annu Rev Mater Res, 1989, 41(1): 99–132.
- [15] Liu ZQ, Jiang M, Zhao JM, et al. Efficacy of a wound-dressing biomaterial on prevention of postinflammatory hyperpigmentation after suction blister epidermal grafting in stable vitiligo patients: a controlled assessor-blinded clinical study with *in vitro* bioactivity investigation [J]. Arch Dermatol Res, 2020, 312(9): 635–645.
- [16] Waite JH, Tanzer ML. Polyphenolic substance of mytilus edulis: novel adhesive containing L-dopa and hydroxyproline [J]. Science, 1981, 212(4498): 1038–1040.
- [17] Radu M, Chernoff J. An *in vivo* assay to test blood vessel permeability [J]. J Vis Exp, 2013, 16(73): e50062.
- [18] Schoeffner DJ, Warren DA, Muralidara S, et al. Organ weights and fat volume in rats as a function of strain and age [J]. J Toxicol Environ Health A, 1999, 56(7): 449–462.
- [19] Azeemuddin M, Viswanatha GL, Rafiq M, et al. An improved experimental model of hemorrhoids in rats: evaluation of antihemorrhoidal activity of an herbal formulation [J]. ISRN Pharmacol, 2014, 11(4): 530931.
- [20] Faujdar S, Sati B, Sharma S, et al. Phytochemical evaluation and anti-hemorrhoidal activity of bark of *Acacia ferruginea* DC [J]. J Tradit Complement Med, 2018, 9(2): 85–89.
- [21] Kumar P, Shen Q, Pivetti CD, et al. Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation [J]. Expert Rev Mol Med, 2009, 11: e19.
- [22] Waldron NH, Jones CA, Gan TJ, et al. Impact of perioperative dexamethasone on postoperative analgesia and side-effects: systematic review and meta-analysis [J]. Br J Anaesth, 2013, 110(2): 191–200.
- [23] Larsson JM, Karlsson H, Crespo JG, et al. Altered O-glycosylation profile of MUC2 mucin occurs in active ulcerative colitis and is associated with increased inflammation [J]. Inflamm Bowel Dis, 2011, 17(11): 2299–2307.
- [24] Bankole E, Read E, Curtis MA, et al. The relationship between mucins and ulcerative colitis: a systematic review [J]. J Clin Med, 2021, 10(9): 1935.
- [25] Xiao CM. Rationalizing the development of biomaterials with a new way of thinking [J]. Chin J Integr Med, 2011, 17(11): 864–866.
- [26] Gong C, Lu CC, Li BQ, et al. Injectable dopamine-modified poly(α , β -aspartic acid) nanocomposite hydrogel as bioadhesive drug delivery system [J]. J Biomed Mater Res A, 2017, 105(4): 1000–1008.
- [27] Eichele DD, Kharbanda KK. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(33): 6016–6029.
- [28] Sheng YH, Hasnain SZ, Florin TH, et al. Mucins in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2012, 27(1): 28–38.
- [29] Keane TJ, Dziki J, Sobieski E, et al. Restoring mucosal barrier function and modifying macrophage phenotype with an extracellular matrix hydrogel: potential therapy for ulcerative colitis [J]. J Crohns Colitis, 2017, 11(3): 360–368.
- [30] 柯林楠, 汤京龙, 宋茂谦, 等. 贻贝粘蛋白中多巴氧化还原状态表征方法研究 [J]. 中国医疗器械杂志, 2018, 42(5): 365–367.
- Ke LN, Tang JL, Song MQ, et al. Study on the 3, 4-dihydroxyphenylalanine redox state characterization method of mussel adhesive protein [J]. Chin J Med Instrum, 2018, 42(5): 365–367.

[收稿日期] 2021–11–29