

朱星昊,仁青加,卓嘎,等. 麝香安诃痔疮膏皮肤刺激及痔相近模型动物实验研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(9): 1114-1221.

ZHU X H, REN Q J, ZHUO G, et al. Experimental animal studies on skin irritation with Shexiang Anhe hemorrhoid ointment and hemorrhoidal proximity models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(9): 1114-1221.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.09.003

麝香安诃痔疮膏皮肤刺激及痔相近模型 动物实验研究

朱星昊¹,仁青加²,卓嘎²,李闪闪³,吴宗耀²,苗明三³,齐冬梅^{4*}

(1. 山东中医药大学 中医药创新研究院,济南 250355;2. 西藏藏医药大学 藏医药与高原生物重点实验室,拉萨 850000;3. 河南中医药大学 研究生院,郑州 450046;4. 山东中医药大学 实验中心,济南 250355)

【摘要】 目的 探讨麝香安诃痔疮膏的急性毒性、刺激性及通过 TLR4/p38 MAPK/NF- κ B 信号通路对痔相近模型大鼠的影响。**方法** 将 16 只新西兰家兔随机分为正常皮肤痔疮膏组、正常皮肤对照组、破损皮肤痔疮膏组和破损皮肤对照组,每组 4 只。两组痔疮膏给药组家兔脱毛区均匀涂抹麝香安诃痔疮膏(1 g/mL)20 g,两组对照组家兔背部脱毛区均匀涂抹等体积溶媒(甘油、羊毛脂与水的混合物),每天 1 次,连续 14 d。另取 40 只大鼠随机分为正常组、模型组、马应龙组、痔疮膏组,每组 10 只。每天涂抹 1 次,连续 14 d。用药后通过苏木素-伊红(HE)染色法等观察家兔局部皮肤急性毒性和刺激性安全状况。对痔相近大鼠肛周组织原位拍照,观察麝香安诃痔疮膏的疗效,并用游标卡尺测量溃疡长、宽,计算溃疡面积,使用 qRT-PCR 检测大鼠肛周组织中 TLR4、p38 MAPK 和 NF- κ B mRNA 的表达情况。**结果** 对家兔皮肤急性毒性及刺激性作用,与正常皮肤对照组及破损皮肤对照组比较,正常皮肤痔疮膏组家兔体重无明显变化;与破损皮肤对照组比较,麝香安诃痔疮膏对破损皮肤家兔用药 1、24、48、72 h 刺激性评价积分均值分别为 1.5、1.0、0.5 和 0.25,无明显皮肤刺激性。对痔相近大鼠的影响,与模型组比较,痔疮膏组大鼠在经 14 d 给药后症状明显减轻;大鼠溃疡面积均明显减少,具有统计学意义($P < 0.05$);TLR4、p38 MAPK、NF- κ B mRNA 水平显著降低,具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 麝香安诃痔疮膏对家兔皮肤的急性毒性、刺激性较小,是一种安全的外用药膏,在对痔相近大鼠的治疗中取得了较好的疗效,其作用机制可能与抑制 TLR4/p38 MAPK/NF- κ B 信号通路相关。

【关键词】 麝香安诃痔疮膏;皮肤刺激;痔相近模型;TLR4/p38 MAPK/NF- κ B 信号通路

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 09-1114-08

Experimental animal studies on skin irritation with Shexiang Anhe hemorrhoid ointment and hemorrhoidal proximity models

ZHU Xinghao¹, REN Qingjia², ZHUO Ga², LI Shanshan³, WU Zongyao², MIAO Mingsan³, QI Dongmei^{4*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine Innovative Institute of Chinese Medicine and Pharmacy, Jinan 250355, China; 2. University of Xizang Medicine Key Laboratory of Tibetan Medicine and Plateau Biology, Lasa 850000, China; 3. Henan University of Chinese Medicine Graduate School, Zhengzhou 450046, China; 4. Shandong University of Traditional Chinese Medicine Experimental Center, Jinan 250355, China)

Corresponding author: QI Dongmei. E-mail: qidm119@163.com

【基金项目】“十四五”规划内涵建设项目(2022ZYYGH03),2022 年中医学(藏医)博士点建设科研支撑计划项目(BSDJS-22-09),中央引导地方科技发展专项资金项目(YDZX2022140)。

Funded by the Construction Projects within “the Fourteenth Five-Year” Plan(2022ZYYGH03), 2022 Scientific Research Support Program Project for the Construction of Doctoral Programs in Chinese Medicine (Tibetan Medicine) (BSDJS-22-09), Special Funds for the Central Government to Guide Local Scientific and Technological Development(YDZX2022140).

【作者简介】朱星昊,男,在读博士研究生,研究方向:方剂的组分配伍与作用机制。Email: 782707735@qq.com

【通信作者】齐冬梅,女,教授,博士,博士生导师,研究方向:方剂的组分配伍与作用机制。Email: qidm119@163.com

[Abstract] Objective To investigate the acute toxicity, irritation, and other effects of Shexiang Anhe hemorrhoid ointment on hemorrhoid-phased model rats by examining the TLR4/p38 MAPK/NF- κ B signaling pathway. **Methods** Sixteen New Zealand rabbits were randomly divided into an intact skin Shexiang Anhe hemorrhoid ointment group, intact skin control group, broken skin Shexiang Anhe hemorrhoid ointment group, and broken skin control group, with four rabbits in each group. In the experimental group, 20 g of Shexiang Anhe hemorrhoid ointment (1 g/mL) was evenly applied to an area on the rabbits depleted of hair, and an equal volume of solvent (mixture of glycerol, lanolin, and water) was evenly applied to the area on the backs of the rabbits in the control group once a day for 14 days. Another 40 rats were taken and randomly divided into a normal group, model group, Maillard group, and hemorrhoid cream group, with 10 animals in each group. The cream was applied once a day for 14 days. The acute toxicity of the cream in the intact and broken skin of rabbits was observed by hematoxylin and eosin staining and other method after treatment. In situ photographs were taken of the perianal tissues of rats with hemorrhoids to observe the efficacy of Shexiang Anhe hemorrhoid ointment, and the length and width of the ulcers were measured with vernier calipers to calculate the area. Quantitative real time polymerase chain reaction was used to detect the expression of TLR4, p38 MAPK, and NF- κ B mRNA in the perianal tissues of the rats. **Results** Compared with rabbits in the control groups with intact or broken skin, rabbits in the administered group showed no significant difference in body mass. The mean values for the irritation evaluation points for Shexiang Anhe hemorrhoid ointment on rabbits with broken skin for 1 h, 24 h, 48 h, and 72 h were 1.5, 1, 0.5, and 0.25, respectively, showing there was no obvious skin irritation. In the hemorrhoidal rats, Shexiang Anhe hemorrhoid ointment treatment significantly reduced hemorrhoid symptoms after 14 days administration; the ulcer area was significantly smaller ($P < 0.05$) and TLR4, p38 MAPK, and NF- κ B mRNA levels were significantly lower compared with the findings in the model group ($P < 0.05$). **Conclusions** Shexiang Anhe hemorrhoid ointment is a safe topical treatment with minimal acute toxicity and irritation to the skin and achieved good efficacy in the treatment of hemorrhoidal rats. Its mechanism of action may be related to the inhibition of the TLR4/p38 MAPK/NF- κ B signaling pathway.

[Keywords] Shexiang Anhe hemorrhoid ointment; dermal irritation; hemorrhoid model; TLR4/p38 MAPK/NF- κ B signaling pathway

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

痔疮(haemorrhoidal disease,HD)是常见的肛门疾病,也是临床上最常见的结直肠疾病之一^[1]。常表现为出血、脱垂、疼痛、血栓形成、粘液分泌物和瘙痒等症状,给患者带来极大的痛苦^[2]。HD 的发病率较高,达到 87%^[3]。目前临床治疗方法较多,以手术治疗和药物治疗为主。手术治疗多采用红外线凝血/光凝术、注射硬化疗法、开放切除痔切除术和射频消融术等;药物治疗包括现代药物和传统药物,有药丸、栓剂、乳膏和湿巾等。这些疗法虽然能控制 HD 的急性症状,但无法达到治愈的目的,导致反复发作迁延难愈^[4]。因此,寻找安全、有效、便捷的治疗方法显得尤为重要。

藏医藏药是我国传统疗法的瑰宝,在 HD 的治疗上有其独特的方法。藏传医药经典《医学四续》第 3 部秘诀续第 64 章痔疮治法,将 HD 分为隆型、赤巴型、培根型、血型、干型、湿型 6 种类型,隆、赤巴、培根 3 型紊乱失调,致使隆滞聚,腹泻或大便干燥,大便带血腐臭,呈现寒象^[5]。藏药麝香安诃痔疮膏具有解毒消肿、破瘀止血、收敛止痛的作用^[6],尤其适用于培根型 HD 引起的腹胀、胃阳下降,疮面

白色、发痒欲搔等症状。目前越来越多的研究证实,HD 组织中含有大量的炎症细胞和炎症因子^[7]。Toll 样受体 4(toll-like receptor 4,TLR4)是机体免疫和炎症识别系统中的重要跨膜蛋白,在炎症调节中起关键作用。TLR4 能介导 MAPK 信号通路,触发 p38 MAPK 和 NF- κ B,促进炎症基因的表达,导致大量炎症的产生。TLR4/p38 MAPK/NF- κ B 信号通路是一条促炎通路,可加快炎症反应进程。可见,通过药物干预减轻炎症反应可能是治疗 HD 的重要策略。因此,本研究拟明确藏药麝香安诃痔疮膏安全、无刺激的前提下,探讨其通过 TLR4/p38 MAPK/NF- κ B 信号通路抑制炎症反应对痔相近大鼠的干预作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

10 周龄清洁级新西兰家兔 16 只,雌雄各 8 只,体重 2.0 ~ 2.5 kg,适应性喂养 1 周后开始实验。饲养条件:温度(26 ± 2)℃,相对湿度(49 ± 5)%,

标准的 12 h/12 h (光/暗) 循环, 自由进食饮水。8 周龄清洁级 SD 大鼠 (雄性) 共 40 只, 体重 190 ~ 210 g, 分笼饲养, 每笼 5 只, 温度 23 °C, 相对湿度 55%, 标准的 12 h/12 h (光/暗) 循环的饲养环境下, 正常饮食饮水。以上动物均购于郑州市惠济区华兴实验动物养殖场【SCXK(豫)2019-0002】, 动物饲养于河南中医药大学【SYXK(豫)2020-0004】。本实验经过河南中医药大学实验动物伦理委员会审查(DWLL202304100)。

1.1.2 主要试剂与仪器

麝香安诃痔疮膏制备: 精确称取处方量鸭嘴花、藏木香、毛诃子各 15 g, 诃子、西藏猫乳木各 13 g, 加 80% 乙醇 325 mL, 45 °C, 超声提取 60 min, 滤过, 收集滤液, 挥去乙醇, 残渣备用。另外精确称取处方量决明子、余甘子、安息香各 9 g, 粉碎, 过 100 目筛, 细粉备用。取适量水、甘油将挥去乙醇后的残渣和药材细粉混合, 用羊毛脂吸收后, 再加入冰片、人工麝香各 1 g, 混匀, 制得的麝香安诃痔疮膏每克相当于 2.5 g 生药量, 产品批号: 20220715。

甘油 (编号: 56-81-5, 美国宝洁公司); 羊毛脂 (编号: 8006-54-0, 山东东弘化工有限公司); 兔抗大鼠 TLR4、p38 MAPK、NF- κ B 抗体 (武汉赛维尔生物科技有限公司/GB15186、GB153380、GBGB113882); 总 RNA 提取试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司/R1200); 通用逆转录试剂盒、Real-time PCR 荧光定量试剂盒 (上海翊圣生物科技有限公司/11141ES60、11201ES08)。

JK-EAB-2140N 电子分析天平; BX43SYSTEM MICROSCOPE (日本; OLYMPUS); JK-PAUG-250DE 超声波清洗器 (上海精学科学仪器有限公司); RM2245 石蜡切片机 (德国; 莱卡); TGL-18.5M 台式冷冻离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司); YD-6D 型组织包埋机 (金华科迪); StepOne™ 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国应用生物系统公司 (ABI)); 数字测微计、电推剪、兔固定架、烧杯及滤纸若干等。

1.2 方法

1.2.1 模型制备、分组和给药

取 16 只新西兰家兔, 随机数字表法将其分为 4 组, 正常皮肤痔疮膏组 (NSZCG 组)、正常皮肤对照组 (NSDZ 组)、破损皮肤痔疮膏组 (BSZCG 组) 和破损皮肤对照组 (BSDZ 组), 每组 4 只。用药前 24 h, 家兔背部脊柱两侧脱毛, 左右各 2 cm × 2 cm。

破损皮肤造模: BSZCG 组和 BSDZ 组背部脱毛区消毒后, 参照文献^[8]造模, 渗血即可。待 24 h 后, BSZCG 组均匀涂抹麝香安诃痔疮膏 (1 g/mL) 20 g, BSDZ 组涂抹等体积溶媒 (甘油、羊毛脂与水的混合物)。双层纱布和聚乙烯薄膜覆盖破损处, 无刺激性胶布固定^[9-11]。

取 40 只 SD 雄性大鼠随机分为正常组 (ZC 组)、模型组 (MX 组)、马应龙组 (MYL 组)、痔疮膏组 (ZCG 组), 每组 10 只。除 ZC 组外, 其余各组在肛周皮肤同一位置每只注射 0.1 mL 的 75% 冰醋酸致肛周溃疡复制大鼠痔疮模型, 造模后 24 h 后相机拍照, 见肛周肿胀、炎性渗出即造模成功^[12]。

给药前按压大鼠背部使其排便, 并用生理盐水清理肛周组织, MYL 组大鼠给予肛周组织涂抹马应龙麝香痔疮膏, 厚度 2 mm; ZCG 组大鼠给予肛周组织涂抹麝香安诃痔疮膏, 厚度 2 mm, 每天 1 次, 连续 14 d。

1.2.2 样本采集

给药前与第 7、14 天称重。实验结束, 处死家兔, 取用药局部皮肤, 福尔马林固定。

用 20% 乌拉坦 5 mL/kg 麻醉大鼠, 对肛周组织原位拍照, 观察比较, 并用游标卡尺测量溃疡长、宽, 计算溃疡面积, 然后取大鼠肛周组织, 液氮速冻后于 -80 °C 冰箱中冻存。

1.2.3 指标检测

(1) 观察家兔基本情况并称重: 于实验前 7 和 14 d 分别称重, 并记录其变化。观察家兔饮食、二便、精神状态、死亡情况, 局部皮肤的变化。

(2) 药物急性毒性和刺激性评价: 敷药 6 h 后, 用温水洗净药物。立即观察记录, 并在去除药物后 1、24、48 和 72 h, 记录涂敷部位有无红斑和水肿。然后取各组家兔皮肤做病理切片, 用《皮肤刺激反应评分标准》^[13] (表 1) 进行评分, 并计算刺激平均分, 0 ~ 0.5, 无刺激性; 0.5 ~ 2.0, 轻度刺激性; 2.0 ~ 6.0, 中度刺激性; 6.0 ~ 8.0, 强刺激性。依此方法确定药物皮肤刺激性。

(3) 痔相近模型大鼠局部症状变化: 治疗后观察痔相近模型大鼠肛周的局部症状。

(4) 痔相近大鼠溃疡面积的比较: 计算各组大鼠溃疡面积, 评价疗效。

(5) 苏木素-伊红 (HE) 染色法观察家兔局部皮肤的病理形态学变化: 取“1.2.2”项下固定的家兔局部皮肤, 制作病理切片, HE 染色, OLYMPUS 显

表 1 皮肤刺激反应评分表

Table 1 Skin irritation response scale

项目 Items	具体症状 Symptoms	分值 Score
红斑形成强度 Erythema formation intensity	未出现红斑 No erythema	0
	轻度红斑 Mild erythema	1
	中度红斑 Moderate erythema	2
	重度红斑 Severe erythema	3
	紫红色红斑到轻度焦痂形成 Bruise and mildly crusty	4
水肿 Oedema	未出现水肿 No oedema	0
	轻度水肿 Mild oedema	1
	中度水肿 Moderate oedema	2
	重度水肿 Severe oedema	3
	严重水肿 Extreme oedema	4
红斑及水肿 Erythema and oedema	红斑 + 水肿最高总分值 Erythema + oedema highest score	8

显微镜下观察家兔局部皮肤病理形态变化。

(6)qRT-PCR 检测肛周组织 TLR4、p38 MAPK、NF-κB 的 mRNA 表达定量:在 100 mg 肛周组织中加入提取试剂,进行组织匀浆,提取总 RNA,并检测其浓度及纯度。然后,加入靶基因上下游引物,进行 PCR 扩增^[14-15]。按照扩增程序三步法进行操作,绘制曲线,计算目的基因的相对表达水平,并统计分析^[16]。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 24.0 进行统计分析,计量资料均采用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法

(LSD)检验,方差不齐者采用 Dennett’s 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 麝香安诃痔疮膏对家兔一般情况和体重的影响

各组家兔一般状况未见异常。在观察的 14 d 内,动物正常,无死亡。治疗 14 d 后,与 NSDZ 组比较,NSZCG 组体重无明显变化;与 BSDZ 组比较,BSZCG 组体重亦无明显变化。见表 2。

表 2 麝香安诃痔疮膏对家兔体重的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Shexiang Anhe Hemorrhoids ointment

on the weight of rabbits($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	时间 Time	体重/kg Weight/kg
NSDZ 组 NSDZ group	给药前 Pre-medication	2.26 ± 0.10
	第 7 天 Day 7	2.61 ± 0.10
	第 14 天 Day 14	3.16 ± 0.19
NSZCG 组 NSZCG group	给药前 Pre-medication	2.25 ± 0.14
	第 7 天 Day 7	2.58 ± 0.13
	第 14 天 Day 14	3.10 ± 0.18
BSDZ 组 BSDZ group	给药前 Pre-medication	2.25 ± 0.11
	第 7 天 Day 7	2.70 ± 0.18
	第 14 天 Day 14	3.13 ± 0.10
BSZCG 组 BSZCG group	给药前 Pre-medication	2.27 ± 0.18
	第 7 天 Day 7	2.67 ± 0.12
	第 14 天 Day 14	3.08 ± 0.22

2.2 麝香安诃痔疮膏对家兔正常皮肤及破损皮肤急性毒性的影响

局部组织病理观测可见,完整皮肤无明显变化。破损皮肤用药后棘层细胞有好转现象。见图 1。

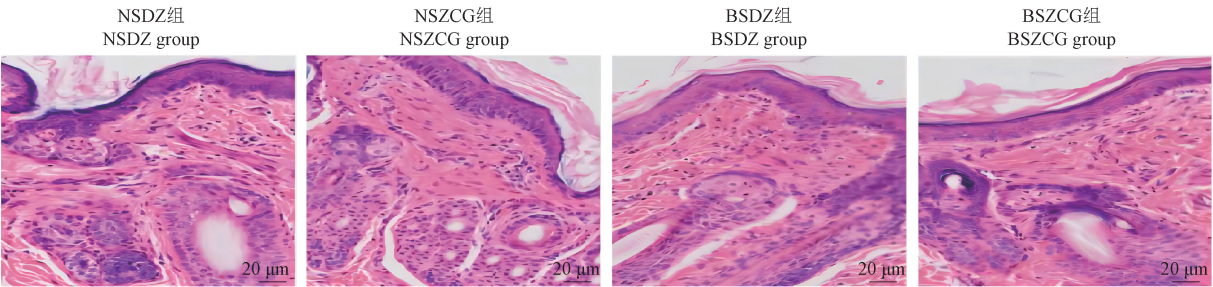


图 1 麝香安诃痔疮膏对家兔正常皮肤、破损皮肤急性毒性组织形态的影响

Figure 1 Effect of Shexiang Anhe Hemorrhoids ointment on the acute toxic histomorphology of normal and broken skin in rabbits

2.3 单次使用麝香安诃痔疮膏对破损皮肤家兔局部刺激性的影响

采用《皮肤刺激反应评分表》和刺激平均分评价单次使用麝香安诃痔疮膏对破损皮肤家兔局部刺激性情况,结果发现正常皮肤家兔,给药后 1 ~ 72 h,皮肤仅在给药 1 h 有轻度刺激,24 ~ 72 h,对家兔皮肤无刺激。破损皮肤组家兔,给药后 1 ~ 72 h,在 1 ~ 24 h 有轻度刺激,24 ~ 48 h 无刺激,48 ~ 72 h 无刺激。见表 3。

表 3 麝香安诃痔疮膏单次应用对家兔局部皮肤刺激性评价积分均值($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Mean value of integral evaluation of local skin irritation in rabbits by a single application of Shexiang Anhe Hemorrhoids ointment($\bar{x} \pm s$)						
组别 Groups	时间/h Time/h	评分/分 Score/point				均值/分 Average value/point
		1	2	3	4	
NSDZ 组 NSDZ group	1	0	1	1	0	0.50 ± 0.58
	24	0	0	1	0	0.25 ± 0.50
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
NSZCG 组 NSZCG group	1	1	1	1	1	1.00 ± 0.00
	24	1	0	1	0	0.50 ± 0.58
	48	1	0	1	0	0.50 ± 0.58
	72	0	0	1	0	0.25 ± 0.50
BSDZ 组 BSDZ group	1	1	1	1	1	1.00 ± 0.00
	24	1	1	0	1	0.75 ± 0.50
	48	0	1	0	1	0.50 ± 0.58
	72	0	0	0	0	0
BSZCG 组 BSZCG group	1	2	1	2	1	1.50 ± 0.58
	24	1	1	1	1	1.00 ± 0.00
	48	1	0	1	0	0.50 ± 0.58
	72	1	0	0	0	0.25 ± 0.50

2.4 麝香安诃痔疮膏对家兔局部皮肤组织刺激性形态学的影响

局部皮肤组织刺激性实验显示,家兔破损皮肤用药组及对照组基底细胞与棘层细胞无肉眼可见病变,稍微可见角化不良现象。麝香安诃痔疮膏单次应用对破损皮肤家兔刺激不明显。见图 2。

2.5 麝香安诃痔疮膏对痔相近大鼠局部症状的影响

ZC 组大鼠肛周组织形态完整, MX 组大鼠肛周组织出现肿胀,存在炎性渗出物,且在 14 d 后仍保持炎性渗出; MYL 组和 ZCG 组大鼠在造模后出现肛周组织肿胀,炎性渗出增多,经 14 d 给药后上述症状明显减轻。见图 3。

2.6 麝香安诃痔疮膏对痔相近大鼠溃疡面积的影响

4 组比较, MX 组大鼠肛周组织溃疡面积显著增加($P < 0.05$); 用药两组, MYL 组和 ZCG 组大鼠肛周组织溃疡面积比 MX 组大鼠溃疡面积显著减小($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 麝香安诃痔疮膏对痔相近大鼠溃疡面积的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of Shexiang Anhe Hemorrhoids ointment on the area of ulcers in rats with similar hemorrhoids ($\bar{x} \pm s, n = 10$)	
组别 Groups	溃疡面积/mm ² Ulcerated area/mm ²
ZC 组 ZC group	0.00 ± 0.00
MX 组 MX group	60.17 ± 3.43 ^a
MYL 组 MYL group	17.67 ± 1.75 ^b
ZCG 组 ZCG group	24.00 ± 1.79 ^b

注:与 ZC 组相比, ^a $P < 0.05$; 与 MX 组相比, ^b $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the ZC group, ^a $P < 0.05$. Compared with the MX group, ^b $P < 0.05$.

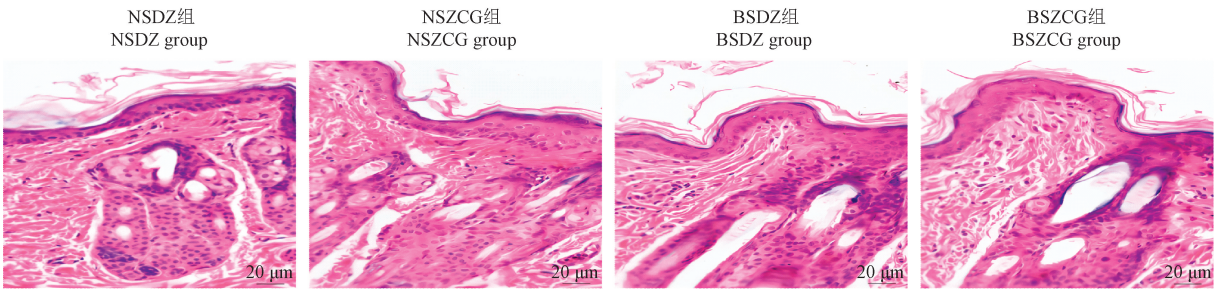


图 2 麝香安诃痔疮膏对家兔皮肤组织刺激性形态影响
Figure 2 Morphological effects of Shexiang Anhe Hemorrhoids ointment on skin tissue irritation in rabbits

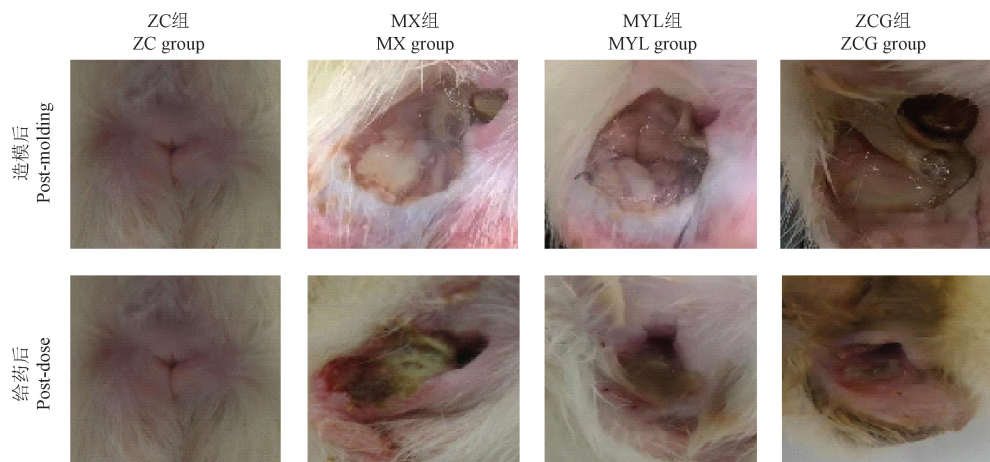


图3 麝香安诃痔疮膏对大鼠肛周组织形态影响

Figure 3 Morphologic effects of Shexiang Anhe Hemorrhoids ointment on perianal tissues of rats

2.7 麝香安诃痔疮膏对痔相近大鼠肛周组织TLR4、p38 MAPK、NF-κB mRNA 的影响

MX 组大鼠肛周组织 TLR4、p38 MAPK、NF-κB mRNA 水平比 ZC 组大鼠显著升高 ($P < 0.05$), 与 MX 组比较, MYL 组和 ZCG 组大鼠肛周组织 TLR4、p38 MAPK、NF-κB mRNA 水平降低, 较 MX 组大鼠有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 麝香安诃痔疮膏对痔相近大鼠肛周组织 TLR4、p38 MAPK 和 NF-κB mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effects of Shexiang Anhe Hemorrhoids ointment on the expression of TLR4, p38 MAPK and NF-κB mRNA in perianal tissues of hemorrhoid-adjacent

rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)			
组别 Groups	p38 MAPK/ $2^{-\Delta\Delta Ct}$	TLR4/ $2^{-\Delta\Delta Ct}$	NF-κB/ $2^{-\Delta\Delta Ct}$
ZC 组 ZC group	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
MX 组 MX group	3.94 ± 0.79 ^a	2.63 ± 0.28 ^a	4.05 ± 0.82 ^a
MYL 组 MYL group	0.58 ± 0.19 ^b	0.52 ± 0.22 ^b	0.60 ± 0.19 ^b
ZCG 组 ZCG group	0.61 ± 0.21 ^b	0.37 ± 0.11 ^b	0.62 ± 0.21 ^b

3 讨论

HD 是临床常见病、多发病, 临床多采用手术治疗, 虽能缓解症状, 但很快复发, 导致疾病迁延难愈, 给患者带来极大的痛苦, 严重影响患者的生活质量。藏医药作为中国民族医药的重要组成部分, 在 HD 的治疗中独具特色。根据课题组临床经验, 麝香安诃痔疮膏治疗 HD 疗效显著。麝香安诃痔疮

膏是一种具有消炎、消肿、止痛作用的软膏, 由安息香、诃子、毛诃子以及鸭嘴花等多种藏药组成, 方中安息香具有开窍清神、行气活血、止痛的功效^[17]; 藏医用使君子科诃子的干燥果实入药, 滋补养身, 升胃火, 助消化, 主治隆、赤巴、培根诱发的疾病; 毛诃子来源于毗黎勒的果实, 清热解毒、收敛养血、调和诸药, 尤善治恶性黄水病; 鸭嘴花味苦、涩, 性凉, 苦入五脏治病^[18], 能清热凉血、消炎止痛、主治血热、肝胆热、多血症等; 决明子清肝明目、润肠通便; 余甘子有清热凉血、消食健胃、生津止咳的功效; 藏木香具有健脾和胃、调气解郁、止痛、安胎的功效, 还用于清血热, 祛风, 治风热症、血热症, 西藏猫乳木抗炎、凉血、消肿, 治黄水。人工麝香具有开窍醒神、活血通经、消肿止痛的功效; 冰片粉具有开窍醒神、清热散毒、明目退翳的功效, 崔利利等^[19]对余甘子软膏中冰片促渗作用进行考察, 认为 5% 的冰片对余甘子软膏中没食子酸和柯里拉京的促渗效果最佳。目前, 该药用于临床 20 余年均取得了较好的治疗作用, 但其药物的急性毒性、刺激性以及治疗痔疮的作用机制均不明确, 严重影响药物的应用推广。基于此, 本研究分别选用家兔和大鼠为研究对象, 探讨麝香安诃痔疮膏的急性毒性和刺激性。结果发现, 该药是一种安全无毒副作用和刺激性的外用软膏; 而后在明确药物安全性的基础上, 制备痔相近大鼠模型验证其疗效并探讨作用机制。

本研究使用冰醋酸肛周注射后大鼠溃疡面积增大、局部组织炎性分泌物不断渗出, 表示痔相近大鼠模型的成功制备。形态学观察也发现, 模型组柱状上皮和鳞状上皮中存在组织间隙疏松和水肿

的情况,局部毛细血管出现增生、出血和瘀血,还可见大量中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等浸润。经麝香安诃痔疮膏干预后,柱状上皮和鳞状上皮中存在组织间隙疏松和水肿情况明显改善,局部毛细血管增生、出血也得到改善。有研究还发现,HD 会导致局部组织损伤,损伤周围的结缔组织和血管壁常会发生严重的炎症反应,表现为 T 淋巴细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等免疫细胞浸润,促进肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和白细胞介素-6 (IL-6) 等炎症细胞因子的分泌^[20]。TNF- α 是巨噬细胞/单核细胞在急性炎症过程中产生的一种炎症细胞因子,可促进 HD 的进展。IL-1 β 、IL-6 作为炎症细胞因子,能促进 HD 的进展。本研究发现,痔相近模型组中肛周组织中存在大量的 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 炎性因子的表达,经麝香安诃痔疮膏干预后,表达降低,提示该药有较好的抗炎作用。

TLR4 的激活被认为对多种炎症信号通路具有重大影响,会触发促炎介质的产生,激活 NF- κ B 和 p38 MAPK 信号通路增强黏附分子和促炎细胞因子的产生。由于 p38 在炎症和应激反应中发挥着重要作用,并且研究发现用特定抑制剂阻断 p38 会导致 NF- κ B 转录活性减弱^[21]。可见,TLR4/p38 MAPK/NF- κ B 是重要的炎症通路。本研究通过 qRT-PCR 对 DNA 扩增的方式检测 TLR4、p38 MAPK、NF- κ B mRNA 的表达情况,结果发现,模型组大鼠肛周组织 TLR4、p38 MAPK、NF- κ B mRNA 水平比正常组大鼠显著升高,经麝香安诃痔疮膏干预后,TLR4、p38 MAPK、NF- κ B mRNA 水平降低,为麝香安诃痔疮膏治疗痔疮的安全性、有效性及机制研究提供了一些可借鉴的经验和方法。

参 考 文 献 (References)

- [1] 孙科,李新,韩彦琪,等. 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 [J]. 中草药, 2023, 54(20): 6734-6742.
SUN K, LI X, HAN Y Q, et al. Pharmacodynamic effect and mechanism of Xiaozhi Pills in *Croton oil* preparation induced hemorrhoidal model in rats [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(20): 6734-6742.
- [2] JIN J, XIA W, CONNOLLY A, et al. Symptom-based scoring for haemorrhoidal disease: a systematic review [J]. Colorectal Dis, 2020, 22(11): 1518-1527.
- [3] SHEIKH P, LOHSIRIWAT V, SHELIGIN Y. Micronized purified flavonoid fraction in hemorrhoid disease: a systematic review and meta-analysis [J]. Adv Ther, 2020, 37(6): 2792-2812.
- [4] YUAN X G, WU J, YIN H M, et al. Comparison of the efficacy and safety of different surgical procedures for patients with hemorrhoids: a network meta-analysis [J]. Tech Coloproctol, 2023, 27(10): 799-811.
- [5] 宇妥·元丹袁波.《医学四续》[M]. 上海:上海科技出版社; 2012.
NINGSUI·Y D G B. Medical fourth continuation [M]. Shanghai: Shanghai Scientific Technical Publishers; 2012.
- [6] 丹增次珍,普布扎西,朱星昊,等. 藏药五味姜黄膏药效学及急性毒性分析 [J]. 医学研究与教育, 2022, 39(6): 1-8.
DANZENG C Z, DANBU Z X, ZHU X H, et al. Analysis and evaluation of pharmacodynamics and acute toxicity of Tibetan medicine Wuwei Jianghuang ointment [J]. Med Res Educ, 2022, 39(6): 1-8.
- [7] 李剑,赵红波,吴洪,等. 槐花消痔汤联合马应龙痔疮膏外敷治疗痔疮的疗效及对血清炎症因子、5-HT 水平的影响 [J]. 四川中医, 2021, 39(2): 95-99.
LI J, ZHAO H B, WU H, et al. Clinical efficacy of using Huaihua Xiaozhi Decoction combined with external application of Mayinglong hemorrhoid ointment in the treatment of hemorrhoids and its effects on levels of serum inflammatory factors and 5-HT [J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2021, 39(2): 95-99.
- [8] 吴玥,薛婧,魏强,等. 国家动物模型资源共享信息平台的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1080-1086.
WU Y, XUE J, WEI Q, et al. Establishment of national infrastructure for an animal model resource platform [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1080-1086.
- [9] 蒋森,王家葵,吴纯洁. 芦竹碱对 2, 4-二硝基氯苯诱导的特应性皮炎小鼠模型的机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(4): 19-25.
JIANG M, WANG J K, WU C J. Ameliorative effect of gramine on 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in mice [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(4): 19-25.
- [10] 江晓雯,方勇飞,冯晓枫,等. 高原脐贴软膏对家兔皮肤急性毒性和刺激性的实验研究 [J]. 中国中医急症, 2015, 24(5): 769-770, 821.
JIANG X J, FANG Y F, FENG X F, et al. Study of transdermal drug delivery of alti plano navel balm on acute toxicity and irritation in experimental rabbits [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2015, 24(5): 769-770, 821.
- [11] 刘沿,胡小垒,许可洪,等. 经皮给药系统皮肤模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 122-128.
LIU Y, HU X L, XU K H, et al. Overview of *in vitro* skin models of transdermal drug delivery systems [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 122-128.
- [12] 周蒙恩,李鹏,金文琪,等. 芩藴凉血合剂对痔病相近动物模型的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(1): 33-39.
ZHOU M E, LI P, JIN W Q, et al. Effect of Qinji Liangxue mixture on animal models of hemorrhoids [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(1): 33-39.
- [13] 马珍珍,刘艳,谢国旗,等. 骨刺散对家兔皮肤急性毒性和刺激性的实验研究 [J]. 中国中医药科技, 2019, 26(1): 39

-41.

MA Z Z, LIU Y, XIE G Q, et al. Experimental study on acute toxicity and irritation of Guci Powder to rabbit skin [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol, 2019, 26(1): 39-41.

[14] 张明昊, 郭申, 杜婧雯, 等. 灯盏花素通过调控 LKB1/AMPK 和 Notch1/Jagged1 通路改善高脂血症大鼠血脂水平及肝肾功能的作用机制研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(6): 2341-2353.

ZHANG M H, GUO S, DU J W, et al. Restoring the blood lipid levels and liver and renal functions of breviscapine on hyperlipidemia rats by regulating LKB1/AMPK and Notch1/Jagged1 signal pathway [J]. Mod Tradit Chin Med Mat Med-World Sci Techn, 2022, 24(6): 2341-2353.

[15] 姜雯雯, 刘欢, 陈晓燕, 等. 京尼平苷通过 PI3K/Akt 通路促进糖尿病大鼠皮肤溃疡创面愈合 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 14-20.

JIANG W W, LIU H, CHEN X Y, et al. Geniposide promotes skin ulcer wound healing in diabetic rats through the PI3K/Akt pathway [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 14-20.

[16] 刘亚敏, 董文霞, 薛鹏坤, 等. 金匮肾气丸通过调控 PI3K-AKT-mTOR 及 PI3K-AKT-GLUT4 通路干预多囊卵巢综合征大鼠的作用机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2023, 39(1): 1-7.

LIU Y M, DONG W X, XUE P K, et al. Intervention effect of Jinkui Shenqi Wan on polycystic ovary syndrome in rats by regulating PI3K-AKT-mTOR and PI3K-AKT-GLUT4 pathways [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2023, 39(1): 1-7.

[17] 侯锡鸿, 张佩林, 王斯娴, 等. 芳香开窍中药对中枢神经系统疾病的治疗作用研究进展 [J]. 药学进展, 2021, 45(5): 372-381.

HOU X H, ZHANG P L, WANG S X, et al. Progress in the research on therapeutic effects of resuscitation-inducing aromatic herbs of traditional Chinese medicine on central nervous system diseases [J]. Prog Pharm Sci, 2021, 45(5): 372-381.

[18] 韩学超, 孙坤坤, 徐琬梨. 苦味中药的归经及临床应用 [J]. 山东中医药大学学报, 2022, 46(4): 463-466.

HAN X C, SUN K K, XU W L. Meridian tropism and clinical application of bitter Chinese materia medica [J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med, 2022, 46(4): 463-466.

[19] 崔利利, 郝佳旭, 查丽春, 等. 余甘子软膏的制备及冰片促渗作用考察 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(18): 1862-1867.

CUI L L, HAO J X, ZHA L C, et al. Preparation of *Phyllanthus emblica* ointment and investigation of the permeation-enhancing effect of borneol [J]. Chin J Hosp Pharm, 2022, 42(18): 1862-1867.

[20] 孙云峰, 王浩, 蒋宁, 等. 消痈溃得康对胃溃疡模型大鼠生长因子和凋亡相关因子的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 186-190.

SUN Y F, WANG H, JIANG N, et al. Effect of xiaoyong kuidekang on expressions of growth factors and apoptosis related factors in rat ulcer model [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2013, 19(5): 186-190.

[21] UNENKHUU B, KIM D B, KIM H S. MKP-3 suppresses LPS-induced inflammatory responses in HUVECs via inhibition of p38 MAPK/NF-κB pathway [J]. Anim Cells Syst, 2021, 25(4): 235-244.

[收稿日期] 2024-04-11