

加味补中益气汤治疗Ⅲ度大鼠内痔分子生物学 作用机制分析*

姜华¹, 梁靖华²

(1. 陕西中医药大学附属医院肛肠一科, 陕西 咸阳 712000; 2. 西安市中医医院, 陕西 西安 710001)

摘要: 目的: 分析加味补中益气汤治疗Ⅲ度内痔分子生物学作用机制。方法: 选取健康 SD 大鼠 20 只, 平均体重 $208.16 \pm 20.49\text{g}$, 三月龄, 随机将大鼠分成两组, 观察组 (10 只)、对照组 (10 只), 肛周注射 75% 冰醋酸法造模, 而后观察组大鼠使用加味补中益气汤灌胃, 对照组无菌蒸馏水灌胃, 观察大鼠便血及痔核脱出评分改变状况, 取大鼠肛垫组织标本, Western blot 法检测组织内 Fibulin-5 蛋白表达状况, Real-time PCR 法检测组织内 Fibulin-5 mRNA 表达状况, 检测处死时大鼠血清 D-二聚体 (D-D)、纤维蛋白原 (FIB) 含量及部分活血凝血活酶时间 (APTT)、血浆凝血酶原时间 (PT) 和凝血酶原时间 (TT) 状况。结果: 灌药 14 天后, 观察组大鼠痔核脱出及便血评分显著降低, 较造模后差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 观察组大鼠 Fibulin-5 mRNA 与 Fibulin-5 蛋白表达均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 观察组大鼠血清 FIB、D-D 含量及 TT、PT 时间较对照组显著降低, APTT 时间较对照组升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 加味补中益气汤可改善大鼠痔相近动物模型出血情况, 缓解肛周局部溃疡及水肿症状。

关键词: 内痔; 补中益气汤; 分子生物学; 临床疗效

中图分类号: R 285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3649 (2018) 07-0074-03

Analysis on Molecular Biological Mechanism of Using Modified Buzhong Yiqi Decoction in the Treatment of Degree III Internal Hemorrhoids/JIANG Hua//1. The First Division of Anus and Intestine, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine (Xianyang Shaanxi 712000, China); 2. Xi'an Hospital of Traditional Chinese Medicine (Shaanxi Xi'an 710021, China)

Abstract: Objective: Analysis on molecular biological mechanism of using Buzhong Yiqi Decoction in the treatment of degree III internal hemorrhoids. Methods: 20 healthy SD rats, average weight $208.16 \pm 20.49\text{g}$, march age, were randomly divided into two groups, observation group (10 rats) and controlled group (10 rats), perianal injection of 75% acetic acid model, then observed rats to use Buzhong Yiqi Decoction orally, the controlled group of sterile distilled water, rats in the stool and prolapse of hemorrhoids score change, specimens of anal cushion tissue of rats, the expression of Fibulin-5 protein in western detection by blot, expression of Fibulin-5 mRNA Real-time PCR method in tissue detection, detection of serum D-D in rats were sacrificed two dimers (D-D), fibrinogen (FIB) content and blood thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT) and prothrombin time (TT) status. Results: Irrigation after 14 days treatment, observation of prolapse of hemorrhoids and hematochezia rats score decreased significantly, the difference was statistically significant compared with the model ($P < 0.05$); The observation group rats Fibulin-5 mRNA and Fibulin-5 protein expression were higher than the controlled group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); The observation group rats serum FIB, D-D content and TT, PT was significantly lower than the controlled group,

* 基金项目: 陕西省中医药管理局 2013~2015 年度中医药科学技术研究课题 (编号: 13-LC014)

[5] Chappell JC, Monillessaux KP, Baute VL. Flt-1 (vascular endothelial growth factor receptor-1) is essential for the vascular endothelial growth factor-Notch feedback loop during angiogenesis [J]. Arterioscler Thromb Vase Biol, 2013, 33 (8): 1952~1959

[6] Pedrosa AR, Trindade A, Fernandes AC, et al. Endothelial Jagged1 antagonizes Dll4 regulation of endothelial branching and promotes vascular maturation downstream of Dll4/Notch1 [J]. Arterioscler Thromb Vase Biol, 2015, 35 (5): 1134~1146

[7] 徐婷. 加减黄芪汤内服与复方黄柏液外洗治疗糖尿病足溃疡临床疗效及对血管内皮功能的影响 [J]. 四川中医, 2017, 35 (12): 125~127

[8] 李琼峰. 黄芪桂枝汤联合西药治疗老年糖尿病足的临床观察 [J]. 四川中医, 2017, 35 (5): 113~115

[9] 陈宇琼, 孙东岳, 吴恒房, 等. 黄芪甲苷改善过氧化氢诱导的人主动脉内皮细胞氧化应激损伤的研究 [J]. 南京医科大学学报·自然科学版, 2017, 37 (8): 949~954

[10] 许崇花, 王洪新, 唐富天, 等. 黄芪甲苷对过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21 (16): 101~104

[11] 魏冰, 姜希娟, 卢斌, 等. Ox-LDL 对内皮细胞 CD40 信号表达的影响及黄芪甲苷的抗炎作用 [J]. 天津中医药大学学报, 2017, 36 (4): 282~285

[12] Qiao Y, Fan CL, Tang MK. Astragaloside IV protects rat retinal capillary endothelial cells against high glucose-induced oxidative injury [J]. Drug Des Devel Ther. 2017, 13 (11): 3567~3577

(收稿日期 2018-03-04)

APTT increased compared with the controlled group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). Conclusion: Modified Buzhong Yiqi Decoction can improve the bleeding of the animal model of similar hemorrhoids in rats and relieve the local ulcers and edema symptoms in the perianal.

Keywords: Prolapsed internal hemorrhoids; Buzhong Yiqi Decoction; Molecular biology; Clinical efficacy

内痔为临床较为常见且比较多发疾病,随着经济快速发展,人们生活方式和饮食习惯发生了很大改变,内痔发病率也逐渐升高,对患者生活和工作产生了严重影响。当前,关于内痔比较权威理论有两种,一为“静脉曲张学说”,此学说认为痔静脉发生曲张迂曲造成了内痔^[1-3],但随着肛垫出现,产生了“肛垫下移学说”,此学说认为机体肛管黏膜的下静脉丛发生曲张为正常生理性扩张,并不是病理状况,且直肠分布的上动脉并没有固定模式,国内外相关学者也更认同此种说法。截至目前,肛垫下移与内痔发病机制尚不完全明了,内痔患者分子生物学相关研究已成为当前临床研究的热点^[4]。因此,本文通过分析补中益气汤对Ⅲ度内痔分子生物学作用机制,为临床患者治疗提供一些实验室依据。

1 资料与方法

1.1 实验动物 选取由西安交通大学医学院实验动物中心提供健康SD大鼠20只,许可证号为:SCXK(陕)2017-003,平均体重 $208.16\pm 20.49\text{g}$,三月龄,适应性喂养10天以后进行实验;随机将大鼠分成两组,观察组(10只)、对照组(10只)。

1.2 饲养条件 笼具都经过高温灭菌,垫料是清洁柔软干燥木屑,室内环境清洁,温度在 $20\sim 26^{\circ}\text{C}$ 间,湿度在40%~60%间,通风、采光良好,自由饮食、饮水。

1.3 建立模型 使用肛周注射75%冰醋酸法,大鼠肛周消毒以后,使用0.1ml针筒抽取0.05ml 75%冰醋酸在肛门周边注射,24小时以后产生溃疡。大鼠肛周边缘肿胀程度高于皮肤,溃疡面积高于 0.2cm^2 说明造模成功。

1.4 给药方式 观察组大鼠每天使用加味补中益气汤(白术10g,黄芪18g,甘草8g,人参10g,柴胡8g,当归14g,升麻6g,陈皮8g,赤芍8g,丹参10g,槐花14g,地榆14g,土茯苓10g)灌胃,给药剂量依据《医学动物实验学》进行转换,每天 3.25g ,浓度为 0.10g/ml ,溶剂量为102ml;对照组则使用无菌蒸馏水灌胃;大鼠在造模成功24小时后给药,连续给药14天后使用脱颈法处死大鼠。

1.5 疗效判定 便血评分:射血3分,滴血2分,带血1分,无血0分;痔核脱出评分:需要辅助回纳2分,可自行复位1分,无脱出0分。

1.6 观察指标及方法 ①大鼠标本在10%福尔马林溶液内固定,脱水、包埋,连续切片,HE染色,在显微镜下查看标本形态;观察大鼠便血及痔核脱出评分改变状况;②取大鼠肛垫组织标本,Western blot法检测组织内Fibulin-5蛋白表达状况,Real-time PCR法检测组织内Fibulin-5mRNA表达状况;③检测处死时大鼠血清D-二聚体(D-D)、纤维蛋

白原(FIB)含量及部分活血凝血活酶时间(APTT)、血浆凝血酶原时间(PT)和凝血酶原时间(TT)状况。

1.7 统计学分析 使用SPSS19.0统计软件进行数据分析,计量资料($\bar{x}\pm s$)表示,独立样本t检验,计数资料 χ^2 检验, $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肛周标本病理学检测 对照组大鼠被鳞状上皮及柱状上皮覆盖,组织间隙疏松水肿,鳞状上皮大片状坏死,固有层内有出血、有大量瘀血,可看到中性粒细胞浸润,黏膜下层局部纤维断裂,小静脉扩张,毛细血管增生。观察组大鼠被鳞状上皮及柱状上皮覆盖,组织间隙水肿显著吸收,鳞状上皮为灶状坏死,固有层有淤血、出血状况,浸润以浆细胞及淋巴细胞为主,黏膜下层局部纤维断裂不明显,血管扩张不明显,毛细血管增生,有少量渗出。

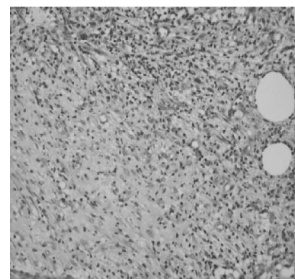


图1 对照组 HE 染色 ($\times 20$)

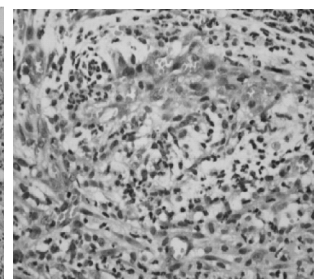


图2 对照组 HE 染色 ($\times 40$)

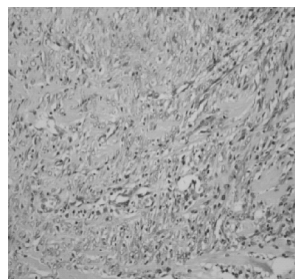


图3 观察组 HE 染色 ($\times 20$)

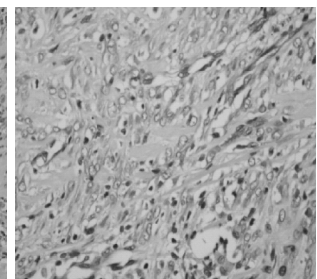


图4 观察组 HE 染色 ($\times 40$)

2.2 大鼠痔核脱出及便血评分改变状况 灌药14天后,观察组大鼠痔核脱出及便血评分显著降低,较造模后差异有统计学意义($P<0.05$),详见表1。

表1 大鼠痔核脱出及便血评分改变状况比较($\bar{x}\pm s$)

组别	痔核脱出评分		便血评分	
	造模后	治疗后	造模后	治疗后
观察组($n=10$)	2.0 ± 0.0	1.12 ± 0.58	1.60 ± 0.78	0.49 ± 0.40
对照组($n=10$)	2.0 ± 0.0	1.98 ± 0.61	1.58 ± 0.75	1.60 ± 0.41

2.3 大鼠组织内 Fibulin-5mRNA 与 Fibulin-5 蛋白表达状况 观察组大鼠 Fibulin-5mRNA 与 Fibulin-5 蛋白表达均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 详见表 2。

表 2 大鼠组织内 Fibulin-5mRNA 与 Fibulin-5 蛋白表达状况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Fibulin-5mRNA	Fibulin-5 蛋白
观察组($n=10$)	0.79±0.14	2.20±1.71
对照组($n=10$)	0.42±0.10	1.79±0.54

2.4 大鼠血清 TT、FIB、D-D、APTT 及 PT 改变状况 观察组大鼠血清 FIB、D-D 含量及 TT、PT 时间较对照组显著降低, APTT 时间较对照组升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 详见表 5。

表 3 大鼠血清 TT、FIB、D-D、APTT 及 PT 改变状况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	D-D (g/L)	TT (s)	FIB (mg/dl)	APTT (s)	PT (s)
对照组($n=10$)	290.18±45.06	22.10±2.83	351.77±90.26	21.20±4.17	17.03±2.29
观察组($n=10$)	215.76±36.19	16.37±2.59	241.18±80.43	29.02±3.65	12.86±1.98

3 讨论

内痔在中医学古籍中最早出现在《五十二病方》内, 并且已有了分类论治的系统理论。《素问》中最早提出了内痔发病原因, 后代不同医家在前人研究基础上有了更深入的认识, 归结起来主要包含以下几个方面, 一为饮食没有节制, 酒色过度, 机体内湿热蕴结于大肠并下注肛门形成; 二为脏腑虚弱, 受到风寒湿热侵袭而产生; 三为久忍大便及久坐, 或者负重远行, 造成热结血脉, 血管阻塞而发病; 四为七情太过, 郁于脏腑间, 造成气血都滞留肛门而形成^[5-8]。

中医学认为, “脾主肌肉”, 肌肉丰满、营养供给和功能实现都需要脾胃功能正常运作。脾胃虚弱, 肌肉不充, 功能弱化, 在肛垫内表征是肛垫支持组织疏松; 脾胃虚弱, 气虚血液统摄无力, 表征是便血, 日久致使气虚下陷, 举托无力, 造成肛垫下移, 痔核脱出。加味补中益气汤内黄芪有升阳固表、补中益气作用, 脾阳得升、恢复中气, 为方中君药; 人参可大补元气, 中气与元气相互转化, 协调恢复气机, 为方中臣药; 在结合当归和营养血, 甘草、白术可补中健脾, 使脾脏运化恢复, 机体气血化生有源头; 柴胡及升麻可升举阳气, 下陷脏器能恢复原位; 赤芍、丹参活血化瘀止痛; 槐花、地榆可清热解毒、止血、消肿敛疮; 土茯苓除湿、通利关节; 陈皮有和胃理气作用^[9-11]。以上药物合用对大鼠疗效显著, 大鼠痔核脱出及便血评分明显降低。肛垫组织内 Fibulin-5mRNA 和 Fibulin-5 蛋白表达降低可能会使结缔组织内弹性纤维的结构出现变化, 表征是密度降低、不规则排列、弹性纤维的含量下降及断裂等, 进而使弹性纤维能力下降或丧失, 加速了肛垫内结缔组织老化^[12-13]。另外, Fibulin-5mRNA 和 Fibulin-5 蛋白表达降低还会造成肛垫黏膜下的窦状血管内弹性纤维发生变性, 表征是弹力板结构不清晰, 进而致使基质金属蛋白酶和抑制调整能力出现

为紊乱, 窦状血管壁的结构成分合成不充分或者出现降解, 形成新生血管, 造成肛垫下移。因此, 肛垫组织内 Fibulin-5mRNA 和 Fibulin-5 蛋白表达降低可能为内痔产生病理学因素, 本文研究显示, 观察组 Fibulin-5mRNA 和 Fibulin-5 蛋白表达均高于对照组。机体内 TT 表示纤维蛋白原转化成纤维蛋白时间, PT 与 APTT 在代表了外源性和内源性的凝血系统情况, 包含相关凝血因子含量及活性状况。血清 FIB 表示纤维蛋白原合成纤维蛋白是否充足, 在机体凝血中纤维蛋白有重要影响。D-D 为交联纤维蛋白降解产物, 机体产生血栓后其含量会明显升高, 是对产生血栓诊断的主要分子之一^[14-15]。本文研究显示, 观察组大鼠血清 FIB、D-D 含量及 TT、PT 是时间较治疗前显著降低, APTT 时间较治疗前升高, 说明补中益气汤对大鼠出血状况改善良好。

综上所述, 加味补中益气汤可改善大鼠内痔相关动物模型出血情况, 缓解肛周局部溃疡及水肿症状。

参考文献

- 葛广德, 胡文辉. 生物补片盆底重建术配合补中益气汤治疗完全性直肠脱垂疗效观察 [J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25 (22): 2463~2465
- 张彩霞. 补中益气汤对 I 度子宫脱垂患者 POP-Q 分度及临床疗效的影响 [J]. 中医药导报, 2016, 9 (8): 90~92
- 金鑫, 万星阳, 黄丹丹, 等. 不同黄芪剂量补中益气汤对脾虚气陷型 III 期内痔患者的治疗效果及对内痔组织 fibulin-3 蛋白表达的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2017, 34 (5): 153~156
- 赵爽, 史玉林. 电刺激生物反馈联合补中益气汤治疗产后 I 度子宫脱垂疗效观察 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 7 (3): 199~201
- 中华医学会外科学分会结直肠肛门外科学组. 痔临床诊治指南 (2006 版) [J]. 中华胃肠外科杂志, 2006, 9 (5): 461~463
- 智建文, 李华山, 杨祎, 等. 消痔灵注射液配合补中益气汤治疗直肠黏膜内脱垂疗效评价 [J]. 蚌埠医学院学报, 2017, 42 (7): 18~23
- 曾晓娟, 张仙, 凌秀兰, 等. 盆底电刺激加生物反馈结合补中益气汤治疗气血虚弱型子宫脱垂的临床观察 [J]. 河北医学, 2016, 22 (7): 1125~1127
- 孟德霞, 张苏闽. 补中益气汤在肛肠科疾病中的临床应用 [J]. 中医学报, 2013, 28 (7): 1072~1075
- 方华, 田良东, 黄俊利. 补中益气汤治疗慢性阻塞性肺疾病临床疗效分析 [J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2017, 16 (7): 520~524
- 周卫东, 刘元铃, 张雪, 等. 补中益气汤合沙参麦冬汤加减联合化疗治疗非小细胞肺癌临床疗效观察 [J]. 实用医学杂志, 2015, 31 (21): 3597~3600
- 曹理璞. 补中益气汤加味治疗急性脑梗塞临床疗效分析 [J]. 四川中医, 2015, 7 (5): 78~80
- 马腾. 补中益气汤加减配合西药治疗儿童重症肌无力性上睑下垂 36 例 [J]. 陕西中医, 2013, 34 (3): 283~284
- 陈春红, 王邦才. 补中益气汤治疗复发性口腔溃疡临床观察 [J]. 中国中医急症, 2014, 23 (5): 939~940
- 梁永妍. 补中益气汤对慢性阻塞性肺疾病疗效及预后指标的影响 [J]. 长春中医药大学学报, 2017, 33 (4): 581~583
- 毕树立, 刘斌, 高海英. 补中益气汤加减联合司来吉兰治疗帕金森病伴功能性便秘的疗效观察 [J]. 中医药导报, 2014, 9 (11): 25~27

(收稿日期 2018-03-17)