

基于 NF - κ B p65 通路研究自拟五倍子汤对大鼠肛瘘术后
镇痛及炎症抑制的作用机制*

袁泉良¹, 张庆东¹, 郭跃¹, 赵文博²

1. 南阳市中心医院, 河南 南阳 473009; 2. 河南省省立医院, 河南 郑州 450000

摘要:目的:探讨自拟五倍子汤对大鼠肛瘘(anal fistula, AF)术后镇痛及炎症抑制作用及其可能作用机制。方法:从 40 只 SD 大鼠中随机选取 10 只作为对照组,其余大鼠建立 AF 模型,造模成功大鼠随机分为模型组、自拟五倍子汤组和阳性对照组,每组 10 只,五倍子汤组大鼠使用自拟五倍子汤煎剂 100 mL 擦洗创面 15 min,擦洗后给予常规包扎;阳性对照组大鼠使用高锰酸钾稀释液 100 mL 擦洗创面 15 min,擦洗后给予常规包扎;对照组及模型组给予等量生理盐水擦洗创面,擦洗后给予常规包扎,每次 1 次,连续干预 14 d。给药第 1、7、14 天后,记录各组大鼠首次舔舐肛周潜伏时间、5 min 内扭体反应次数和舔舐肛周总时长;ELISA 法检测各组大鼠血清肿瘤坏死因子 - α (tumour necrosis factor - α , TNF - α)、白细胞介素 - 1 β (interleukin - 1 β , IL - 1 β)和 IL - 6 的水平;HE 染色观察各组大鼠创面组织病理学变化;Western Blot 和 RT - PCR 检测各组大鼠创面组织核转录因子 - κ B p65(nuclear transcription factor - κ B p65, NF - κ B p65)、环氧合酶 - 2(cyclooxygenase - 2, COX - 2)蛋白和 mRNA 表达情况。结果:给药后第 1、7、14 天,与模型组比较,自拟五倍子汤组大鼠 5 min 内扭体反应次数及舔舐肛周总时长显著减少($P < 0.05$),首次舔舐肛周潜伏时间显著增加($P < 0.05$)。与给药后第 1 天比较,给药后第 7、14 天后,自拟五倍子汤组大鼠 5 min 内扭体反应次数及舔舐肛周总时长显著减少($P < 0.05$),首次舔舐肛周潜伏时间显著增加($P < 0.05$)。与对照组比较,模型组大鼠 TNF - α 、IL - 1 β 、IL - 6 的水平及 NF - κ B p65 和 COX - 2 蛋白与 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,自拟五倍子汤组大鼠 TNF - α 、IL - 1 β 、IL - 6 的水平及 NF - κ B p65 和 COX - 2 蛋白与 mRNA 表达水平显著降低($P < 0.05$)。HE 染色显示:自拟五倍子汤可明显改善大鼠创面组织结构受损,减少胞间渗出液及炎性细胞浸润现象。结论:自拟五倍子汤能明显改善 AF 大鼠炎症因子水平,在一定程度上抑制术后疼痛反应,其作用可能与调节 NF - κ B p65 信号通路有关。

关键词:自拟五倍子汤;肛瘘;术后镇痛;炎症抑制;NF - κ B p65 信号通路;大鼠

DOI:10.16368/j.issn.1674-8999.2023.10.351

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1674-8999(2023)10-2175-07

Mechanism of Self - made Wubeizi Decoction on Analgesia and Inflammation
Inhibition in Rats After Fistula Operation Based on NF - κ B p65 Pathway

YUAN Quanliang¹, ZHANG Qingdong¹, GUO Yue¹, ZHAO Wenbo²

1. Nanyang Central Hospital, Nanyang Henan China 473009; 2. Henan Provincial Hospital, Zhengzhou Henan China 450000

Abstract: Objective: To investigate the effect and possible mechanism of self - made Wubeizi Decoction on analgesia and inflammation inhibition after surgery for anal fistula (AF) in rats. Methods: 10 of the 40 SD rats were randomly selected as the control group, and the remaining rats were established as AF rat models, and the rats with successful modeling were randomly divided into model group, self - simulated quintuple soup group and positive control group, 10 rats in each group, rats in the fivefold soup group were scrubbed with 100 mL of self - made Wubeizi Decoction for 15 min, and routine bandaging was given after scrubbing. Rats in the positive control group were scrubbed with 100 mL of potassium permanganate dilution for 15 min, and routine bandaging was given after scrubbing. The control group and the model group were given the same amount of normal saline to scrub the wound, and after scrubbing, routine dressing was

* 基金项目:2021 年度河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20210253)

given once each time, and continuous intervention was performed for 14 days. After the 1st, 7th and 14th days of administration, the incubation time of the first perianal licking, the number of twisting reactions within 5 minutes and the total duration of perianal licking were recorded in each group. The ELISA method detected the levels of serum tumor necrosis factor - α (TNF - α), interleukin - 1β (IL - 1β) and IL - 6 in each group. HE staining observed the histopathological changes of rat wounds in each group. Western Blot and RT - PCR detected the expression of nuclear transcription factor - κ B p65 (NF - κ B p65), cyclooxygenase - 2 (COX - 2) protein and mRNA in wound tissue in rat wound tissue. Results: On the 1st, 7th and 14th days after administration, compared with the model group, the number of twisting reactions within 5 minutes and the total time of perianal licking were significantly reduced ($P < 0.05$), and the latent time of the first perianal licking was significantly increased in the self - mode Wubiezi Decoction group ($P < 0.05$). Compared with the first day after administration, after the 7th and 14th days after administration, the number of twisting reactions within 5 minutes and the total time of perianal licking in the rats were significantly reduced ($P < 0.05$), and the latent time of the first licking perianal was significantly increased in the self - mode Wubiezi Decoction group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the levels of TNF - α , IL - 1β , IL - 6, NF - κ B p65 and COX - 2 proteins and mRNA expression levels in rats in the model group were significantly increased ($P < 0.05$), and compared with the model group, the levels of TNF - α , IL - 1β , IL - 6 and NF - κ B p65 and COX - 2 proteins and mRNA in rats in the self - mode Wubiezi Decoction group were significantly reduced ($P < 0.05$). HE staining showed that self - made Wubeizi Decoction could significantly improve the damage of wound tissue structure in rats, reduce intercellular exudate and inflammatory cell infiltration. Conclusion: Self - made Wubeizi Decoction can significantly improve the level of inflammatory factors in AF rats and inhibit postoperative pain response to a certain extent, and its effect may be related to the regulation of NF - κ B p65 signaling pathway.

Key words: self - made Wubeizi Decoction; fistula; postoperative analgesia; inflammatory suppression; NF - κ B p65 signaling pathway; rat

肛瘘(anal fistula, AF)是一种临床常见消化系统疾病,指肛管或直肠与肛门周围皮肤之间形成异常肉芽脓性管道,出现脓肿、溃烂等现象,主要与肛腺感染相关^[1]。近年来,AF发病率急剧攀升,且复发率高,严重影响患者生活质量^[2-3]。AF难以自愈,临床中常采用手术方式治疗,但由于手术部位的特殊性一般不予缝合,创面大、愈合缓慢和病程长使术后常出现流脓、水肿、瘙痒、出血和疼痛现象等并发症,还会出现身形消瘦和体温升高等症状^[4-6]。因此,亟须寻找安全有效的治疗药物解决术后疼痛和炎症问题,对提高患者生活质量有着重大意义。传统中医学治疗AF具有丰富的临床经验,将AF称为“肛漏”,根据中医药理论,借鉴古代及现代中药临床使用经验,选取具有治疗痔疮脱肛作用的五倍子汤来治疗AF^[7-8]。本研究通过建立AF大鼠模型,探讨自拟五倍子汤对AF大鼠术后镇痛、炎症反应的抑制作用及其可能作用机制,旨在为AF临床治疗提供新的治疗思路。

1 材料

1.1 实验动物 40只SD大鼠,体质量(220±20)g,动物来源:北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2019-0009。实验前所有大鼠在相同饲养环境下适应性饲养7d,饲养环境设置为:温度20~24℃,湿度(50±10)%,12h明暗交替。适应性饲养期间大鼠可自由进食和饮水。本实

验符合南阳市中心医院动物实验伦理批准,批准号:NYZX-KY-2021123。

1.2 药品与试剂 自拟五倍子汤(由五倍子20g,芒硝30g,桑寄生30g,荆芥30g,莲房30g,大黄20g,明矾20g,赤芍20g,冰片10g,枳壳20g等中药组成,采用高压煎制而成,真空包装,每包150mL,由河南中医药大学第一附属医院制剂室提供);高锰酸钾(正大丰海药业有限公司,批号:JS030516);肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor - α , TNF - α)、白细胞介素- 1β (interleukin - 1β , IL - 1β)、IL - 6 ELISA试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号:H052-1、H628、H037);兔抗 β -actin多克隆抗体、兔抗大鼠核转录因子- κ B p65(nuclear transcription factor - κ B p65, NF - κ B p65)多克隆抗体、兔抗大鼠环氧合酶-2(cyclooxygenase - 2, COX - 2)多克隆抗体及山羊抗兔二抗IgG(美国CST公司,货号:4970、8242、13314、4413)。

1.3 仪器 CFX Connect型荧光定量PCR(美国Bio-Rad公司);Hema9500型基因扩增仪(广东黑马医学仪器有限公司);LEICARM2245型石蜡切片机(德国徕卡公司)。

2 方法

2.1 AF大鼠模型的建立 40只SD大鼠适应性饲养7d后,随机选取10只作为对照组,其余大鼠参考文献方法建立AF大鼠模型^[9],具体如下:将大鼠

注射戊巴比妥钠麻醉后,观察大鼠肛门状态,待肛门完全放松,以肛缘为界,手术刀切开表面皮肤组织直至直肠黏膜。将创面修剪为三角形缺损,深度达肛门括约肌,于伤口处引入纱布条,注入粪水 2 mL,形成“开放、渗血、急性”的状态。反复使用棉签蘸取碘酒溶液擦拭创面,造成局部渗血模拟临床换药刺激,每日 1 次。造模 48 h 后观察创面状态,如果有脓性分泌物,则表示伤口感染,模型建立成功。将造模成功大鼠随机分为模型组、自拟五倍子汤组和阳性对照组,每组 10 只。自拟五倍子汤组大鼠使用自拟五倍子汤煎剂 100 mL 擦洗创面 15 min,擦洗后给予常规包扎^[10-11];阳性对照组大鼠使用高锰酸钾稀释液(1:5 000 稀释)100 mL 擦洗创面 15 min,擦洗后给予常规包扎;对照组及模型组给予等量生理盐水擦洗创面,擦洗后给予常规包扎,每天 1 次,连续干预 14 d。

2.2 疼痛行为学检测 实验期间正常饮食饮水,给药第 1、7、14 天干预后,比较各组大鼠的疼痛行为,记录各组大鼠给予刺激后 5 min 内扭体反应的次数,包括大鼠腹部收紧、身体扭曲、后肢伸展和蠕动等行为;观察并记录大鼠首次舔舐肛周的潜伏时间和 5 min 内舔舐肛周总时长。

2.3 炎症因子水平检测 各组大鼠末次给药后,禁食 12 h,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血,静置 4 h,3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,分离血清,-20 ℃ 保存。实验时提前 30 min 取出血清样品和 ELISA 试剂盒,按照 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 ELISA 试剂盒说明书要求操作。设置标准管、空白管和样品管,分别于各管加入梯度浓度标准品、蒸馏水和样品 50 μL,充分混匀 37 ℃ 水浴 30 min,弃液拍干,各孔内加入抗体工作液 100 μL,37 ℃ 孵育 30 min,洗板拍干,加入显色剂避光反应 20 min,终止反应。酶标仪蒸馏水调零,测定吸光值,绘制标准曲线,计算待测样品浓度。

2.4 HE 染色观察 采血完毕后,颈椎脱臼处死大鼠,迅速分离大鼠肛门创面组织,生理盐水冲洗,切取一部分创面组织于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h 备用。将固定好的创面组织使用梯度浓度乙醇溶液脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。采用组织切片机将蜡块切成 5 μm 的薄片,切片热水中烫平,盖上载玻片,烤箱烘干。苏木精染色液浸染 5 min,流水冲洗,盐酸酒精分化 10 s,流水冲洗,伊红染液浸染 2 min,流水冲洗,再次脱水透明,中性树脂封片,光学显微镜下观察大鼠创面组织病理学变化。

2.5 RT-PCR 检测 NF-κB p65 mRNA、COX-2 mRNA 表达水平 取部分创面组织,按照 RNA 提取试剂盒说明书操作,提取总 RNA,将 RNA 逆转录为 cDNA 后保存备用,cDNA 样品稀释 10 倍为模板,配制反应混合液 20 μL,其中 TransScript RT/RI Enzyme Mix 1 μL、Anchored Oligo(dT)18(0.5 g·L⁻¹) 1 μL、2×TS Reaction Mix 10 μL、总 RNA 1 μg、ddH₂O 7 μL。反应程序如下:95 ℃ 预变性 10 min,95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火 30 s,共进行 35 个循环。剔除误差较大数据,分析溶解曲线及扩增曲线,根据检测结果以 2^{-ΔΔCT} 相对定量计算公式计算各样品目的基因相对定量结果并进行分析,所有实验重复 3 次取平均值。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列
NF-κB p65	F:5'-CCGGAGAGGAGACTTCAC-3'
	R:5'-TCCACGATTCCCAGAGA-3'
COX-2	F:5'-TTGAAGAAGAGCCCATCCTC-3'
	R:5'-CAGCTCATATGGGTCCGAC-3'
β-actin	F:5'-TAGATGACCATGAGTCGCTTGC-3'
	R:5'-GCCAAACTTGCTCCATGTCCGG-3'

2.6 Western Blot 检测相关蛋白表达水平 称取适量各组大鼠创面组织,在冰上剪碎并匀浆裂解,加入蛋白酶抑制剂和细胞裂解液,匀浆至充分裂解。低温离心,吸取上清液,BCA 法测定蛋白浓度。取 20 μg 蛋白,12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离后转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉摇床封闭 2 h,分别加入以 1:2 000 比例稀释的兔抗大鼠一抗 NF-κB p65、COX-2 和 β-actin 抗体,4 ℃ 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,加入以 1:4 000 比例稀释的二抗,室温下孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,滴加适量 ECL 发光试剂工作液,静置 1 min。凝胶分析系统采集图像并分析,Image J 软件分析各蛋白条带灰度值。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计学软件分析数据,计量数据均以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠 5 min 内扭体反应情况比较 给药第 1、7、14 天后,与模型组比较,自拟五倍子汤组、阳性对照组大鼠 5 min 内扭体反应次数显著减少($P < 0.05$)。与自拟五倍子汤组比较,阳性对照组大鼠

5 min 内扭体反应次数差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与给药第 1 天后比较, 给药后第 7、14 天后自拟五倍子汤组、阳性对照组大鼠 5 min 内扭体反应次数显著减少 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠 5 min 内扭体反应情况比较 ($\bar{x} \pm s$, 次)

组别	<i>n</i>	第 1 天	第 7 天	第 14 天
对照组	10	—	—	—
模型组	10	13.60 ± 2.24	12.30 ± 1.90	11.10 ± 2.07
自拟五倍子汤组	10	9.70 ± 1.27 [△]	7.20 ± 1.47 ^{△#}	3.30 ± 1.27 ^{△#}
阳性对照组	10	9.00 ± 1.34 [△]	6.70 ± 1.49 ^{△#}	2.50 ± 1.02 ^{△#}

注: 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与给药第 1 天比较, $\#P < 0.05$ 。

3.2 各组大鼠首次舔舐肛周潜伏时间比较 给药第 1、7、14 天, 与模型组比较, 自拟五倍子汤组、阳性对照组大鼠首次舔舐肛周潜伏时间显著增加 ($P < 0.05$)。与自拟五倍子汤组比较, 阳性对照组大鼠首次舔舐肛周潜伏时间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与给药第 1 天后比较, 给药第 7、14 天后自拟五倍子汤组、阳性对照组大鼠首次舔舐肛周潜伏时间显著增加 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠首次舔舐肛周潜伏时间比较 ($\bar{x} \pm s$, s)

组别	<i>n</i>	第 1 天	第 7 天	第 14 天
对照组	10	—	—	—
模型组	10	1.64 ± 0.74	1.84 ± 0.83	2.54 ± 0.90
自拟五倍子汤组	10	4.75 ± 1.23 [△]	7.75 ± 1.61 ^{△#}	10.82 ± 2.08 ^{△#}
阳性对照组	10	5.04 ± 1.59 [△]	8.13 ± 1.77 ^{△#}	11.09 ± 2.25 ^{△#}

注: 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与给药第 1 天比较, $\#P < 0.05$ 。

3.3 各自大鼠 5 min 内舔舐肛周总时长比较 给药第 1、7、14 天后, 与模型组比较, 自拟五倍子汤组、阳性对照组大鼠 5 min 内舔舐肛周总时长显著减少 ($P < 0.05$)。与自拟五倍子汤组比较, 阳性对照组大鼠 5 min 内舔舐肛周总时长差异无统计学意义

($P > 0.05$)。与给药第 1 天后比较, 给药第 7、14 天后自拟五倍子汤组、阳性对照组大鼠 5 min 内舔舐肛周总时长显著减少 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 各组大鼠 5 min 内舔舐肛周总时长比较 ($\bar{x} \pm s$, min)

组别	<i>n</i>	第 1 天	第 7 天	第 14 天
对照组	10	—	—	—
模型组	10	3.44 ± 0.40	3.09 ± 0.33	2.65 ± 0.28
自拟五倍子汤组	10	2.77 ± 0.30 [△]	1.83 ± 0.19 ^{△#}	0.58 ± 0.07 ^{△#}
阳性对照组	10	2.46 ± 0.26 [△]	1.41 ± 0.16 ^{△#}	0.50 ± 0.05 ^{△#}

注: 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与给药第 1 天比较, $\#P < 0.05$ 。

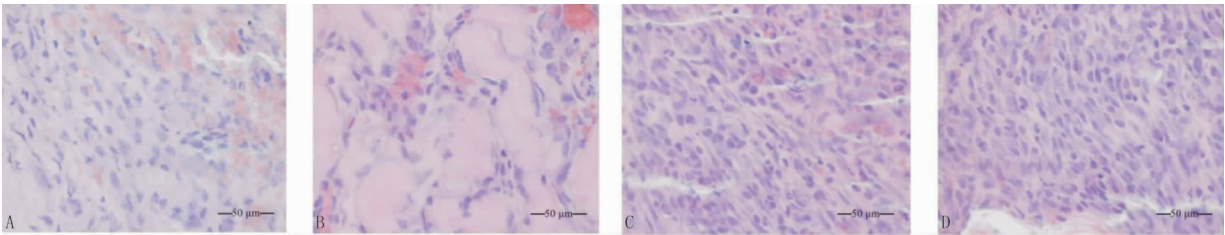
3.4 各组大鼠血清炎症因子水平比较 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 自拟五倍子汤组、阳性对照组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均显著降低 ($P < 0.05$)。与自拟五倍子汤组比较, 阳性对照组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 5。

表 5 各组大鼠血清炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$, ng · L⁻¹)

组别	<i>n</i>	TNF- α	IL-1 β	IL-6
对照组	10	122.24 ± 10.60	34.34 ± 3.77	41.43 ± 4.23
模型组	10	214.15 ± 16.37 [*]	58.16 ± 4.92 [*]	82.83 ± 6.02 [*]
自拟五倍子汤组	10	123.27 ± 13.50 [△]	39.49 ± 3.29 [△]	48.74 ± 4.96 [△]
阳性对照组	10	126.53 ± 10.91 [△]	36.21 ± 3.05 [△]	44.36 ± 4.43 [△]

注: 与对照组比较, $*P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

3.5 各组大鼠创面组织病理变化比较 结果显示, 对照组大鼠创面组织结构完整, 未见细胞肿胀、炎性细胞浸润等现象。模型组大鼠创面组织结构破坏严重, 细胞间存在大量渗出液, 炎性细胞浸润现象较严重。自拟五倍子汤组、阳性对照组大鼠创面组织结构受损现象均得到改善, 胞间渗出液减少, 炎性细胞浸润现象明显减少。见图 1。



注: A: 对照组; B: 模型组; C: 自拟五倍子汤组; D: 阳性对照组。

图 1 各组大鼠创面组织 HE 染色结果 (×200, 标尺 = 50 μm)

3.6 各组大鼠创面组织 NF- κ B p65 mRNA 和 COX-2 mRNA 水平比较 与对照组比较, 模型组

大鼠创面组织 NF- κ B p65 mRNA 和 COX-2 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比

较,自拟五倍子汤组、阳性对照组大鼠创面组织 *NF-κB p65* mRNA 和 *COX-2* mRNA 表达水平均显著降低($P<0.05$)。与五倍子汤组比较,阳性对照组大鼠创面组织 *NF-κB p65* mRNA 和 *COX-2* mRNA 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。见表6。

表6 各组大鼠 *NF-κB p65* mRNA 和 *COX-2* mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	<i>NF-κB p65</i> mRNA	<i>COX-2</i> mRNA
对照组	10	1.07 ± 0.10	1.02 ± 0.10
模型组	10	1.85 ± 0.16 *	1.55 ± 0.14 *
自拟五倍子汤组	10	0.64 ± 0.05 ^Δ	0.78 ± 0.06 ^Δ
阳性对照组	10	0.59 ± 0.06 ^Δ	0.73 ± 0.06 ^Δ

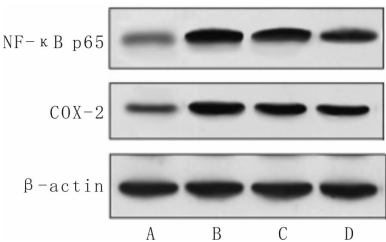
注:与对照组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$ 。

3.7 各组大鼠创面组织 *NF-κB p65* 和 *COX-2* 蛋白表达水平比较 与对照组比较,模型组大鼠创面组织 *NF-κB p65* 和 *COX-2* 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,五倍子汤组、阳性对照组大鼠创面组织 *NF-κB p65* 和 *COX-2* 蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。与五倍子汤组比较,阳性对照组大鼠创面组织 *NF-κB p65* 和 *COX-2* 蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。见表7、图2。

表7 各组大鼠 *NF-κB p65* 和 *COX-2* 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	<i>NF-κB p65</i> /β-actin	<i>COX-2</i> /β-actin
对照组	10	0.54 ± 0.06	0.39 ± 0.04
模型组	10	0.99 ± 0.09 *	0.96 ± 0.09 *
自拟五倍子汤组	10	0.64 ± 0.06 ^Δ	0.54 ± 0.05 ^Δ
阳性对照组	10	0.60 ± 0.04 ^Δ	0.51 ± 0.06 ^Δ

注:与对照组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$ 。



注:A:对照组;B:模型组;C:自拟五倍子汤组;D:阳性对照组。

图2 各组大鼠创面组织 *NF-κB p65* 和 *COX-2* 蛋白条带图

4 讨论

中医理论认为,AF患者多存在湿热现象,湿热下注于肛肠可导致周边经脉瘀滞,邪毒内生,进而引起病理变化,产生溃烂^[12-14]。临床中采用的肛痿切

除术、挂线术等方式,虽能将溃烂的组织切除,但无法治疗内里,清散体内余毒。手术方式亦会使患者气血受损、经络不通,使得湿热瘀血难以随经络行散而积蕴于肌肤,导致创面难以愈合,患者术后疼痛不已^[15-17]。故需及时清热解毒、散瘀化浊以抑制炎症反应,促进创面愈合。因此,针对AF发病机制进行研究,开发新型治疗方式,对提高AF患者生活质量有着重大意义。

近年来,随着对AF研究的深入,一些传统中医药方在临床治疗AF中取得良好效用^[18-20]。中医药指出,AF患者接受手术之后,受经脉、肌肉断裂影响,局部湿热和血瘀现象较重,虽使用清热祛瘀的药方口服治疗亦可达到治疗效果,但起效较晚,难以消除患者早期疼痛之苦,故选用汤方直接作用于患处,疗效更佳^[21]。五倍子汤来源于《疡科选粹》,在前人的基础上,自拟五倍子汤方可有效清热解毒,收敛效果更佳。故本研究建立AF大鼠模型,探讨五倍子汤对AF大鼠术后镇痛及炎症反应的影响,探究其可能作用机制。在本次研究中,自拟的五倍子汤中五倍子酸涩收敛,可止血、消肿止痛;芒硝有清热、消肿止痛之用;大黄苦寒凉,可清热止血、活血祛瘀、泻火解毒,外用能消肿、利湿止痛,三味药共为君药。方中明矾具有敛疮消肿的作用,桑寄生可清热除湿,荆芥可散风热、消疮肿,莲房可化癖止血,赤芍有凉血、散癖止痛的作用,冰片微寒,可消肿止痛。以上诸药共为臣药以奏清热消肿活血止痛的功效。枳壳行气消肿止痛,气行则血行,为佐药。全方偏苦咸寒,起到清热解毒、行气通络、活血散癖、消肿止痛之功。结果显示,模型组大鼠精神萎靡,进食量、饮水量明显减少,创面渗液较多,创口愈合极为缓慢,提示模型组大鼠肛肠组织受到损伤,创面感染且伴有严重的炎症反应。在观察各组大鼠疼痛行为学中发现,在给予自拟五倍子汤和阳性药物干预后,自拟五倍子汤组和阳性对照组大鼠5 min内扭体反应次数、5 min内舔舐肛周总时长显著减少,首次舔舐肛周潜伏时间则显著增加。动物行为是直接反应实验对象当下状态的客观指标,提示各实验组大鼠术后疼痛现象明显改善,自拟五倍子汤和阳性药物可以有效促进大鼠术后创面的恢复。术后疼痛的病理学基础是由炎症因子持续刺激产生,在本研究中发现,自拟五倍子汤组和阳性对照组大鼠血清中炎症因子TNF-α、IL-1β和IL-6水平均呈降低趋势,表明各组大鼠体内的炎症反应得到抑制,疼痛现象也随之减少。此外,在观察创面组织切片时发现,与模型

组比较,各组大鼠创面组织结构受损现象均得到改善,胞间渗出液减少,炎性细胞浸润现象明显减少。进一步证实自拟五倍子汤可以减轻大鼠体内的炎性反应,改善大鼠术后疼痛现象。为验证五倍子汤对AF大鼠的作用机制,将通过NF-κB p65信号通路探讨其对术后疼痛和炎症的作用机制。

NF-κB信号通路是典型的炎症调控信号通路,组织在持续性的炎症微环境暴露下,激活促炎细胞释放大炎症因子,引发炎症的联级反应^[22-24]。在本研究中,模型组大鼠创面组织中NF-κB p65、COX-2基因与蛋白水平均高度表达,结合大鼠血清中炎症因子TNF-α、IL-1β和IL-6水平异常升高,提示模型组大鼠创面感染后,体内NF-κB信号通路被激活。NF-κB作为启动炎症的关键因子,从与IκBs形成的复合物中解离进入细胞核,同时促进下游因子COX-2高度表达,COX-2是疼痛诱导阶段的关键限速酶,在促炎因子的刺激下可以迅速表达于局部组织中,直接参与疼痛超敏反应的生理过程^[25-26]。在给予大鼠自拟五倍子汤和阳性药物治疗后,检测各组大鼠NF-κB p65信号通路活性时发现,NF-κB p65的蛋白表达活性受到了抑制。p65是NF-κB的一个亚基,是判断炎症反应程度的标志物,NF-κB p65活性受到抑制后,炎症因子水平逐渐下降,相关COX-2基因与蛋白表达水平也逐渐恢复低水平状态,疼痛反应受到抑制^[23,27-28]。根据以上研究结果推测,自拟五倍子汤能够抑制AF大鼠纤维化过程和炎症反应,可能是与NF-κB p65/TGF-β1信号通路有关。

综上所述,自拟五倍子汤能够改善AF大鼠血清中炎症因子水平,在一定程度上抑制术后疼痛反应,可能是通过调节NF-κB p65信号通路发挥作用,为临床治疗AF提供实验依据。

参考文献:

[1] SENDLER M, WEISS F U, GOLCHERT J, et al. Cathepsin B-mediated activation of trypsinogen in endocytosing macrophages increases severity of pancreatitis in mice[J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(3):704-718.

[2] HUANG H J, SWIDNICKA-SIERGIEJKO A K, DANILUK J, et al. Transgenic expression of PRSS1R122H sensitizes mice to pancreatitis[J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(4):1072-1082.

[3] 王新策, 刘越军, 张靖, 等. 减压引流结合中医松弛挂线治疗括约肌上肛瘘[J]. *中医学报*, 2022, 37(11):2465-2469.

WANG X C, LIU Y J, ZHANG J, et al. Decompression and drainage combined with relaxation and thread-drawing in traditional Chinese medicine for the treatment of anal fistula above sphincter[J]. *Acta Chin Med*, 2022, 37(11):2465-2469.

[4] PAUK M, KUFNER V, RUMENOVIC V, et al. Iron overload in aging Bmp6^{-/-} mice induces exocrine pancreatic injury and fibrosis due to acinar cell loss[J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(4):60.

[5] LIAO Y, TAN R Z, LI J C, et al. Isoliquiritigenin attenuates UUO-induced renal inflammation and fibrosis by inhibiting mincle/syk/NF-kappa B signaling pathway[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14:1455-1468.

[6] GIAMUNDO P, ANGELIS M D. Treatment of anal fistula with FiLaC®: results of a 10-year experience with 175 patients[J]. *Tech Coloproctol*, 2021, 25(8):941-948.

[7] LIU X N, ZHU Q T, ZHANG M, et al. Isoliquiritigenin ameliorates acute pancreatitis in mice via inhibition of oxidative stress and modulation of the Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018:7161592.

[8] TANG Y, LUO H J, XIAO Q, et al. Isoliquiritigenin attenuates septic acute kidney injury by regulating ferritinophagy-mediated ferroptosis[J]. *Ren Fail*, 2021, 43(1):1551-1560.

[9] DU F, GESANG Q Z, CAO J, et al. Isoliquiritigenin attenuates atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(11):1932.

[10] MUELLER A C, PIPER M, GOODSPEED A, et al. Induction of ADAM10 by radiation therapy drives fibrosis, resistance, and epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer[J]. *Cancer Res*, 2021, 81(12):3255-3269.

[11] MA H D, WANG X D, ZHANG W L, et al. Melatonin suppresses ferroptosis induced by high glucose via activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway in type 2 diabetic osteoporosis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020:9067610.

[12] CHEN Y R, ZHANG P, CHEN W R, et al. Ferroptosis mediated DSS-induced ulcerative colitis associated with Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *Immunol Lett*, 2020, 225:9-15.

[13] 黄璇. 中药熏洗配合微波治疗湿热下注型肛瘘术后60例[J]. *中外医学研究*, 2016, 14(36):117-118.

HUANG X. Treatment of 60 cases of anal fistula after operation by fumigation and washing with traditional Chinese medicine combined with microwave[J]. *Chin Foreign Med Res*, 2016, 14(36):117-118.

[14] 龙舟, 黄文伊. 益气愈创汤治疗湿热下注型低位肛瘘术后患者疗效及对血清EGF、TGF-β1、VEGF的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2020, 29(34):3834-3837.

LONG Z, HUANG W Y. Effect of Yiqi Yuchuang Decoction on postoperative patients with low anal fistula with downward flow of damp – heat and its influence on serum EGF, TGF – β 1 and VEGF[J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2020, 29(34): 3834 – 3837.

[15] CAO L J, YAN M, MA Y X, et al. Isoliquiritigenin protects against triptolide – induced hepatotoxicity in mice through Nrf2 activation[J]. Pharmazie, 2016, 71(7): 394 – 397.

[16] 陈凯迪, 严建, 曹晖, 等. 基于“卫气营血”理论探讨象皮生肌膏在肛瘘术后创面中的应用[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(12): 1978 – 1980, 1994.

CHEN K D, YAN J, CAO H, et al. Discussion on the application of Xiangpi Shengji plaster in wounds after anal fistula operation based on "Wei – qi – ying – Xue" theory[J]. J Basic Chin Med, 2021, 27(12): 1978 – 1980, 1994.

[17] 王羽桐, 罗芳. 疼痛护理干预对肛瘘手术患者术后创面疼痛及预后影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(11): 159 – 162.

WANG Y T, LUO F. Effect of pain nursing intervention on postoperative wound pain and prognosis of patients with anal fistula surgery[J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2021, 23(11): 159 – 162.

[18] 瞿胤, 张志君, 郑德, 等. 促愈熏洗方对肛瘘术后患者创面愈合及创面肉芽组织的影响[J]. 陕西中医, 2022, 43(10): 1414 – 1418.

QU Y, ZHANG Z J, ZHENG D, et al. Effect of Cuyu Xunxi recipe on wound healing and granulation tissue of patients after anal fistula operation[J]. Shaanxi J Tradit Chin Med, 2022, 43(10): 1414 – 1418.

[19] 叶杰阳, 庞苏滨, 张圣江, 等. 消肿生肌汤对肛瘘术后患者肉芽组织 Bax、P53、Caspase – 3 水平的影响[J]. 长春中医药大学学报, 2021, 37(3): 567 – 570.

YE J Y, PANG S B, ZHANG S J, et al. Effect of Xiaozhong Shengji Decoction on Bax, P53 and Caspase – 3 levels in granulation tissue of patients after anal fistula operation[J]. J Chang Univ Chin Med, 2021, 37(3): 567 – 570.

[20] 张承岳, 刘远成, 张劲远. 止痛如神汤对肛瘘术后创面愈合效果及血清纤维连接蛋白、表皮生长因子水平的影响[J]. 国际中医中药杂志, 2021, 43(7): 653 – 657.

ZHANG C Y, LIU Y C, ZHANG J Y. Effect of Zhitong – Rusheng Decoction on wound healing and serum fibronectin and epidermal growth factor levels after anal fistula operation[J]. Int J Tradit Chin Med, 2021, 43(7): 653 – 657.

[21] GUO X, CAO P P, LIAN X F, et al. The neuroprotective effect of phillyrin in intracerebral hemorrhagic mice is produced by activation of the Nrf2 signaling pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2021, 909: 174439.

[22] VERMA S, DUTTA A, DAHIYA A, et al. Quercetin – 3 – Rutinoside alleviates radiation – induced lung inflammation and fibrosis via regulation of NF – κ B/TGF – β 1 signaling[J]. Phytomedicine, 2022, 99: 154004.

[23] HASSAN A A, MOUSTAFA E M, EL – KHASHAB I H, et al. Mangosteen hinders gamma radiation – mediated oxidative stress and liver injury by down – regulating TNF – α /NF – κ B and pro – fibrotic factor TGF – β 1 inducing inflammatory signaling[J]. Dose Response, 2021, 19(2): 15593258211025190.

[24] ZHOU Y Y, HE C H, LAN H A, et al. Rhamnocitrin decreases fibrosis of ovarian granulosa cells by regulating the activation of the PPAR γ /NF – κ B/TGF – β 1/Smad2/3 signaling pathway mediated by Wisp2[J]. Ann Transl Med, 2022, 10(14): 789.

[25] SUN W P, WU Y Q, GAO M Y, et al. C – reactive protein promotes inflammation through TLR4/NF – κ B/TGF – β pathway in HL – 1 cells[J]. Biosci Rep, 2019, 39(8): BSR20190888.

[26] PRABHAKARAN J, MOLOTKOV A, MINTZ A, et al. Progress in PET imaging of neuroinflammation targeting COX – 2 enzyme[J]. Molecules, 2021, 26(11): 3208.

[27] KIM S R, SEONG K J, KIM W J, et al. Epigallocatechin gallate protects against hypoxia – induced inflammation in microglia via NF – κ B suppression and nrf – 2/HO – 1 activation[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(7): 4004.

[28] ZHAI Z Y, ZHANG X J, DING Y C, et al. Eugenol restrains abdominal aortic aneurysm progression with down – regulations on NF – κ B and COX – 2[J]. Phytother Res, 2022, 36(2): 928 – 937.

收稿日期: 2023 – 06 – 16

作者简介: 袁泉良 (1981 –), 男, 河南南阳人, 大学本科, 副主任医师, 研究方向: 普通外科、肛肠科。

编辑: 孙亚萍