

消肿止痛液消肿、促溃疡面愈合、镇痛的有效部位筛选^Δ

王银洁^{1,2*}, 刘本臣¹, 刘 军¹, 官凯敏¹, 赛纪虎¹, 张久存¹, 王宏伟¹(1.银川市中医医院制剂中心, 银川 750001; 2.广州中医药大学中药学院, 广州 510006)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)13-1801-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.13.15

摘要 目的:筛选消肿止痛液具有消肿、促溃疡面愈合、镇痛的有效部位,为其二次开发为软膏剂提供参考。方法:采用D101大孔树脂分离得到消肿止痛液的水洗脱部位和20%、40%、60%、95%乙醇洗脱部位。将120只SD大鼠随机分为正常组($n=8$)和造模组($n=112$);正常组大鼠不作处理,造模组大鼠采用肛周皮肤注射75%冰醋酸致肛周溃疡复制大鼠痔疮模型;将96只成模大鼠随机分为模型组[空白软膏基质0.51 g/(kg·d)],阳性组[马应龙麝香痔疮膏0.51 g/(kg·d)],消肿止痛液及其水洗脱部位和20%、40%、60%乙醇洗脱部位的高、低剂量组[按生药计给药剂量均分别为8.34、2.78 g/(kg·d)],均制成含药软膏,每组8只;肛周涂抹给药,每天给药2次,连续给药7 d;观察给药第3、7天大鼠肛周局部症状以及给药第7天大鼠肛周局部黏膜组织病理形态并分别进行评分,考察各洗脱部位的消肿、促溃疡面愈合作用。分别取120只ICR小鼠随机分为模型组[空白软膏基质1.03 g/(kg·d)],阳性组[马应龙麝香痔疮膏1.03 g/(kg·d)]和消肿止痛液及其各洗脱部位的高、低剂量组[按生药计均分别为16.65、5.55 g/(kg·d)],均制成含药软膏,每组10只;经皮给药,每天给药2次,连续给药3 d;末次给药30 min后,分别通过醋酸扭体实验检测小鼠的扭体潜伏时间、15 min扭体次数以及热板致痛实验检测小鼠的痛阈值,考察各洗脱部位的全身和局部镇痛作用。结果:在消肿、促溃疡面愈合考察实验中,与正常组比较,模型组大鼠在给药第3、7天肛周局部症状评分以及在给药第7天肛周局部黏膜组织病理评分均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,阳性组和40%乙醇洗脱部位高、低剂量组大鼠上述评分均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),20%乙醇洗脱部位高剂量组大鼠在给药第3、7天以及60%乙醇洗脱部位组大鼠在给药第7天肛周局部症状评分显著降低($P<0.05$)。在镇痛考察实验中,与模型组比较,阳性组和40%乙醇洗脱部位高、低剂量组以及60%乙醇洗脱部位高剂量组小鼠的扭体潜伏时间显著缩短,15 min扭体次数均显著减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$),20%乙醇洗脱部位高剂量组小鼠扭体潜伏时间显著缩短($P<0.05$);阳性组、40%乙醇洗脱部位高、低剂量组小鼠给药后痛阈值显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:消肿止痛液40%乙醇洗脱部位具有较好的消肿、促溃疡面愈合和镇痛作用。

关键词 消肿止痛液;有效部位;消肿;促溃疡面愈合;镇痛;大鼠;小鼠

Screening of Active Parts in Xiaozhong Zhitong Lotion for Reducing Swelling, Promoting Ulcer Healing and Analgesia

WANG Yinjie^{1, 2}, LIU Benchen¹, LIU Jun¹, GONG Kaimin¹, SAI Jihu¹, ZHANG Jiucun¹, WANG Hongwei¹
(1.Preparation Center, Yinchuan Hospital of TCM, Yinchuan 750001, China; 2.School of TCM, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To screen active fractions of Xiaozhong zhitong lotion that are able to reduce swelling, promote ulcer healing and analgesia, and to provide reference for it's secondary development of ointment preparation. **METHODS:** Water elution fraction and 20%, 40%, 60%, 95% ethanol elution parts were separated by D101 macroporous resin from Xiaozhong zhitong lotion. 120 SD rats were randomly divided into normal group ($n=8$) and modeling group ($n=112$). Rats in the normal group were not treated. Hemorrhoids model was established in the model group by injecting 75% glacial acetic acid into the perianal skin to induce perianal ulcer. 96 model rats were randomly divided into model group [blank ointment matrix 0.51 g/(kg·d)], positive group [Mayinglong ointment, 0.51 g/(kg·d)], high-dose and low-dose groups of Xiaozhong zhitong lotion and it's water elution fraction and 20%, 40%, 60% ethanol elution parts [8.34, 2.78 g/(kg·d) by crude drug, all make into containing drug ointment], with 8 rats in each group. The periphery of the anus was smeared with relevant medicine, twice a day, for consecutive 7 d. The local symptoms around the anus of rats 3 and 7 days after administration and the pathological morphology of the local mucosa around the anus of rats 7 days after administration were observed and scored respectively. The effects of each elution part for reducing swelling and promoting ulcer healing were investigated. 120 ICR mice were randomly divided into model group [blank ointment matrix 1.03 g/(kg·d)], positive group [Mayinglong ointment 1.03 g/(kg·d)], high-dose and low-dose groups of Xiaozhong zhitong lotion and it's each elution part [16.65, 5.55 g/(kg·d) by crude drug, all make into containing drug ointment], with 10 mice in each group.

^Δ 基金项目:宁夏回族自治区重点研发计划项目(No.2016-KJHM112);宁夏青年科技人才托举工程项目

* 主管中药师,博士研究生。研究方向:中药药效物质基础及中药制剂技术。电话:0951-5058083。E-mail:wyjie41@163.com

Transdermal administration, twice a day, for consecutive 7 d. After 30 min of last administration, the latency time and 15 min writhing times of mice were detected by designing acetic acid writhing test; pain threshold of mice was determined by

hot-plate pain test so as to investigate systemic and local analgesic effects of each elution part. RESULTS: In the detumescence and ulcer healing test, compared with normal group, the score of local symptoms around anus at 3rd and 7th day of administration as well as pathological score of hemorrhoids local mucosa were increased significantly in model group ($P<0.01$). Compared with model group, above scores of positive group, 40% ethanol elution high-dose and low-dose groups were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). The scores of local symptoms around anus in 20% ethanol elution part high-dose group at 3rd and 7th day after medication as well as 60% ethanol elution part group at 7th day after medication were decreased significantly ($P<0.05$). In analgesia test, compared with model group, writhing latency time was shortened significantly and 15 min writhing times was decreased significantly in positive group, 40% ethanol elution part high-dose and low-dose groups as well as 60% ethanol elution part high-dose group ($P<0.05$ or $P<0.01$); writhing latency time of 20% ethanol elution part high-dose group was shortened significantly ($P<0.05$). Pain threshold of mice was increased significantly in positive group, 40% ethanol elution part high-dose and low-dose groups after medication ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: The 40% ethanol elution part from Xiaozhong zhitong lotion is the effective part that can reduce swelling, promote ulcer healing and analgesia.

KEYWORDS Xiaozhong zhitong lotion; Active part; Reducing swelling; Promoting ulcer healing; Analgesia; Rat; Mice

消肿止痛液是银川市中医医院(下文简称“我院”)制剂(批准文号:宁药制字Z20140005),主要由地榆、黄柏、大黄、五倍子等八味中药组成,在我院临床已应用多年,用于治疗各种原因所致的痔疮初期及外痔、混合痔、肛裂和痔疮术后的消肿止痛等,治疗肛肠疾病术后疼痛水肿的临床总有效率达93.33%^[1]。但由于消肿止痛液为外用洗剂,临床采用坐浴熏洗的给药方式,用药方法较为烦琐,限制了其使用。考虑到软膏制剂较易被患者接受,为此,欲将消肿止痛液开发为软膏制剂。但软膏制剂存在载药量小的特点,按原制剂给药剂量制备软膏,制剂无法成型(药物含量过大),故需对其进行有效部位筛选。鉴于此,本研究用大孔树脂对消肿止痛液进行分离,得到不同极性部位,将分离得到的部位制备为软膏剂,通过醋酸致大鼠肛周溃疡(痔疮模型)实验、醋酸致小鼠扭体实验(全身疼痛)、小鼠热板实验(局部疼痛)3个药效实验筛选消肿止痛液具有消肿、促溃疡面愈合、镇痛作用的有效部位,为将其二次开发为软膏制剂提供参考。

1 材料

1.1 仪器

YLS-6B智能热板仪(济南益延科技发展有限公司); RE-500旋转蒸发仪(巩义市予华仪器有限责任公司)。

1.2 药品与试剂

消肿止痛液(由我院制剂中心提供,批号:20170706,规格:200 mL,每1 mL含生药量为0.26 g);硬脂酸、羧苯乙酯、甘油(湖南尔康制药股份有限公司,批号:101820150901、103620170605、000120161004);三乙醇胺(成都华邑药用辅料制造有限责任公司,批号:20170401);D101大孔树脂(安徽三星树脂科技有限公司);蒸馏水、乙醇、冰醋酸(四川金山制药有限公司)。

1.3 动物

SD大鼠120只(♀♂各半,体质量180~220 g)和ICR小鼠260只[♀:200只、♂:60只,体质量均为18~22 g],均由宁夏医科大学实验动物中心提供[实验动物生产许可证号:SCXK(宁)2015-0001]。将大、小鼠饲养于宁夏医科大学实验动物中心SPF级动物房中,适应性饲养1周后用于实验。

2 方法

2.1 消肿止痛液各极性部位的制备

取消肿止痛液若干瓶,浓缩干燥,制备为干膏粉,备用。取适量干膏粉溶于蒸馏水中,上D101大孔树脂柱^[2],使药液高于树脂面约2 cm,静置吸附12 h,依次用蒸馏水和体积分数分别为20%、40%、60%、95%的乙醇梯度洗脱,每个梯度洗脱5个柱体积,收集合并相应部位洗脱液,浓缩干燥,得各洗脱部位干粉,水洗脱部位得率为36.61%、20%乙醇洗脱部位得率为10.49%、40%乙醇洗脱部位得率为12.11%、60%乙醇洗脱部位得率为2.44%、95%乙醇洗脱部位得率为0.97%。

2.2 醋酸致大鼠肛周溃疡实验

2.2.1 分组、造模与给药 取SD大鼠120只(♀♂各半)随机分为正常组($n=8$)和造模组($n=112$)。正常组大鼠不作处理,造模组大鼠采用肛周皮肤注射75%冰醋酸(0.05 mL/只)致肛周溃疡复制大鼠痔疮模型^[3]。于造模后24 h,进行局部症状评分,分值在6分以上认为造模成功^[4-5]。将96只造模成功的大鼠随机分为模型组,阳性组,消肿止痛液高、低剂量组,水以及20%、40%、60%乙醇洗脱部位的高、低剂量组[由于95%乙醇洗脱部位的得率低(0.97%),再加上考虑到原制剂制备工艺为水提,其有效成分在95%乙醇洗脱部位的可能性较低,故未对该部位进行药效筛选],每组8只。于造模成功后开始给药,每天给药2次(每天9:00 a.m.和1:00 p.m.各给药1次),连续给药7 d。全方消肿止痛液临床给药剂量以生药计为27 g/(kg·d),换算为大鼠的给药剂量以生药计为2.78 g/(kg·d),本研究采用临床剂量的3倍剂量和临床剂量分别作为高、低剂量,即消肿止痛液高、低剂量组和4个洗脱部位高、低剂量组大鼠的给药剂量均分别为8.34、2.78 g/(kg·d),取适量全方消肿止痛液和各洗脱部位干粉,分别与软膏基质混合制成含药软膏后^[6],按以上剂量于大鼠肛周涂抹给药;阳性组大鼠肛周涂抹马应龙麝香痔疮膏0.51 g/(kg·d)(临床等效剂量);正常组、模型组大鼠肛周涂抹等量空白软膏基质[0.51 g/(kg·d)]。

2.2.2 肛周局部症状评分 在给药第3、7天,分别测量大鼠肛门肿胀程度及溃疡的长、宽,并计算溃疡面积,观察各组大鼠肛周肿胀程度、炎性渗出及溃疡面积,从这3

个方面对局部症状进行评分^[5]。(1)肿胀程度:0分,无肿胀;1分,勉强可见肿胀;2分,可见边缘高出皮肤;3分,红肿隆起 ≥ 1 mm。(2)炎性渗出:0分,无炎性渗出;1分,有少许炎性渗出;2分,有炎性渗出;3分,炎性渗出多。(3)溃疡面积:0分,无溃疡面积;1分,溃疡面积 ≤ 0.2 cm²;2分,溃疡面积 $0.2\sim 0.3$ cm²;3分,溃疡面积 ≥ 0.3 cm²。以上3个方面指标评分相加即为最终评分结果。

2.2.3 肛周局部黏膜组织病理形态观察 在给药第7天进行局部评分后,将大鼠处死,取各组大鼠肛周组织,固定于10%中性缓冲福尔马林溶液中,脱水,石蜡包埋,切片(4 μ m),苏木素-伊红(HE)染色,进行病理学检查。病理学检查在我院病理科进行。参考中华中医药学会中药实验药理专业委员会2017年颁布的《中药痔疮动物模型制备规范(草案)起草说明》中的“痔疮局部黏膜组织病理观察分级参考标准”进行病理评分^[3],评分标准为:-,0分;+,1分;++,2分;+++,3分。“痔疮局部黏膜组织病理观察分级参考标准”具体如下:“-”表示黏膜上皮正常。“+”表示黏膜上皮细胞部分变性;黏膜下有较多中性粒细胞及单核细胞浸润,间质充血水肿。“++”表示黏膜上皮细胞部分变性脱落,形成小溃疡;黏膜下有较多中性粒细胞及单核细胞浸润,偶有小脓肿形成,间质充血水肿;黏膜表面有较多脓细胞、纤维蛋白及坏死的组织碎片。“+++”表示黏膜上皮细胞部分变性坏死脱落,形成较大溃疡;黏膜下有大量中性粒细胞及单核细胞浸润,有较多小脓肿形成,炎细胞波及整个肌层,肌纤维部分变性;间质明显充血、出血、水肿,黏膜表面有大量脓细胞、纤维蛋白及坏死的组织碎片。

2.3 醋酸致小鼠扭体实验

2.3.1 分组与给药 取ICR小鼠120只(♀♂各半)随机分为模型组,阳性组,消肿止痛液高、低剂量组,水以及20%、40%、60%乙醇洗脱部位的高、低剂量组,每组10只。按临床给药剂量换算,消肿止痛液的小鼠给药量以生药计为5.55 g/(kg·d)。本研究采用临床剂量的3倍剂量和临床剂量分别作为高、低剂量,即消肿止痛液高、低剂量组和4个洗脱部位高、低剂量组大鼠的给药剂量以生药计均分别为16.65、5.55 g/(kg·d),取适量消肿止痛液及其各部位干粉与软膏基质配制含药软膏后给药;模型组小涂抹等量软膏基质;阳性组小鼠涂抹马应龙麝香痔疮膏1.03 g/(kg·d)(临床等效剂量)。给药前,将小鼠背部脱毛,经皮给药,每天给药2次(每天9:00 a.m.和1:00 p.m.各给药1次),连续给药3 d。

2.3.2 镇痛率测定 末次给药30 min后,各组小鼠均腹腔注射0.6%冰醋酸,剂量为每只0.2 mL^[7-9],观察各组小鼠出现扭体反应的时间(扭体潜伏时间)及15 min内出现扭体反应的次数(以小鼠出现腹部内凹、躯干与后肢伸张,臀部高起为扭体反应),计算镇痛率:镇痛率(%)=(模型组平均扭体次数-给药组平均扭体次数)/模型组平均扭体次数 $\times 100\%$ 。

2.4 小鼠热板实验

2.4.1 分组与给药 取140只ICR小鼠(♀),调节恒温装置使热板控制在 (55 ± 0.5) °C,预热30 min。每次将1只小鼠放在热板上,记录其开始舔后足的时间(s),即为此鼠的痛阈值(正常为 $5\sim 30$ s)^[10-12], < 5 s或 > 30 s者不用。将正常痛阈值小鼠120只随机分为模型组,阳性组,消肿止痛液高、低剂量组,水以及20%、40%、60%乙醇洗脱部位的高、低剂量组,每组10只。给药剂量和给药方法同“2.3.1”项下。

2.4.2 痛阈值测定 末次给药30 min后,分别测量各组小鼠痛阈值,若60 s无反应,其痛阈值按60 s计算,计算痛阈提高百分率:痛阈提高百分率(%)=(给药后痛阈值-给药前痛阈值)/给药前痛阈值 $\times 100\%$ 。

2.5 统计学方法

采用SPSS 20.0统计软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,配对比较用配对 t 检验(给药第3天和给药第7天的局部症状评分比较以及给药前痛阈值和给药后痛阈值的比较),两组间比较用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析中的两两比较(Dunnett- t 检验),若方差不齐或数据不符合正态分布,则采用非参数Wilcoxon秩和检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 醋酸致大鼠肛周溃疡实验结果

3.1.1 局部症状评分结果 与正常组比较,模型组大鼠在给药第3天和第7天均显示出肛周肿胀、炎性渗出及具有溃疡,局部症状评分显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,在给药第3天,阳性组、20%乙醇洗脱部位高剂量组、40%乙醇洗脱部位高剂量组和低剂量组以及60%乙醇洗脱部位高剂量组大鼠肛周溃疡症状均得到改善,局部症状评分显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);在给药第7天,除以上5组外,60%乙醇洗脱部位低剂量组大鼠肛周溃疡症状也得到明显改善,局部症状评分也显著降低($P<0.05$)。结果提示,20%、40%、60%乙醇洗脱部位可能为消肿止痛液有效部位。各组大鼠给药后局部症状评分结果见表1。

3.1.2 病理观察及评分结果 正常组大鼠肛周局部组织无明显病理形态学改变,黏膜上皮正常。模型组大鼠肛周局部组织皮肤断裂,黏膜上皮细胞部分变性坏死脱落,黏膜下有大量中性粒细胞及单核细胞浸润,有较多小脓肿形成,间质明显充血、出血、水肿,黏膜表面有大量脓细胞、纤维蛋白及坏死的组织碎片符合炎性病理学改变,与文献报道^[3]的大鼠醋酸致肛周溃疡的痔疮病理结果相似,且该病理改变与文献报道的人急性嵌顿性痔的病理形态特征相似^[13]。阳性组大鼠黏膜上皮部分细胞变性,黏膜下有少量中性粒细胞及单核细胞浸润,轻度间质充血水肿。消肿止痛液高、低剂量组大鼠肛周黏膜下有较多中性粒细胞及单核细胞浸润,黏膜上皮细胞部分变性脱落,黏膜表面有较多脓细胞、纤维蛋白及坏死的组织碎片。水洗脱部位高、低剂量组大鼠肛周局部组织皮肤断裂,黏膜上皮细胞部分变性坏死脱落,黏膜下有大量中性粒细胞及单核细胞浸润,有较多小脓肿形

表1 各组大鼠肛周局部症状评分结果($\bar{x} \pm s, n=8$)
Tab 1 Scores of local symptoms around the anus of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	局部症状评分	
	给药第3天	给药第7天
正常组	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	7.13±0.83**	6.75±0.71**
阳性组	4.63±0.52 ^{##}	2.00±0.76 ^{##}
消肿止痛液高剂量组	6.13±0.99	6.00±0.76
消肿止痛液低剂量组	6.25±1.04	5.88±0.99
水洗脱部位高剂量组	6.75±0.89	6.13±0.64
水洗脱部位低剂量组	6.38±0.92	6.25±0.71
20%乙醇洗脱部位高剂量组	6.00±0.76 [#]	5.63±0.74 [#]
20%乙醇洗脱部位低剂量组	6.13±1.13	5.88±1.13
40%乙醇洗脱部位高剂量组	4.88±0.83 ^{##}	2.38±0.74 ^{##}
40%乙醇洗脱部位低剂量组	5.50±0.93 [#]	3.00±0.76 ^{##}
60%乙醇洗脱部位高剂量组	5.88±0.99 [#]	5.25±0.89 ^{##}
60%乙醇洗脱部位低剂量组	6.25±1.28	5.75±0.71 [#]

注:与正常组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$
Note: vs. normal group, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$

成,间质明显充血、出血、水肿。20%乙醇洗脱部位高、低剂量组大鼠肛周组织黏膜下有较多中性粒细胞及单核细胞浸润,有较多小脓肿形成,间质明显充血、出血、水肿。40%乙醇洗脱部位高、低剂量组大鼠黏膜上皮细胞均较为正常,黏膜下有少量中性粒细胞,轻度间质充血水肿和少量血栓形成。60%乙醇洗脱部位高剂量组较模型组有所改善,黏膜上皮细胞变性坏死较少,黏膜下中性粒细胞及单核细胞浸润,偶有小脓肿形成,间质充血水肿,黏膜表面脓细胞减少等;60%乙醇洗脱部位低剂量组大鼠肛周黏膜上皮细胞有坏死,黏膜下部分中性粒细胞和单核细胞浸润,偶有血栓,黏膜表面有少量脓细胞。各组大鼠痔疮局部组织病理形态学观察结果见图1。

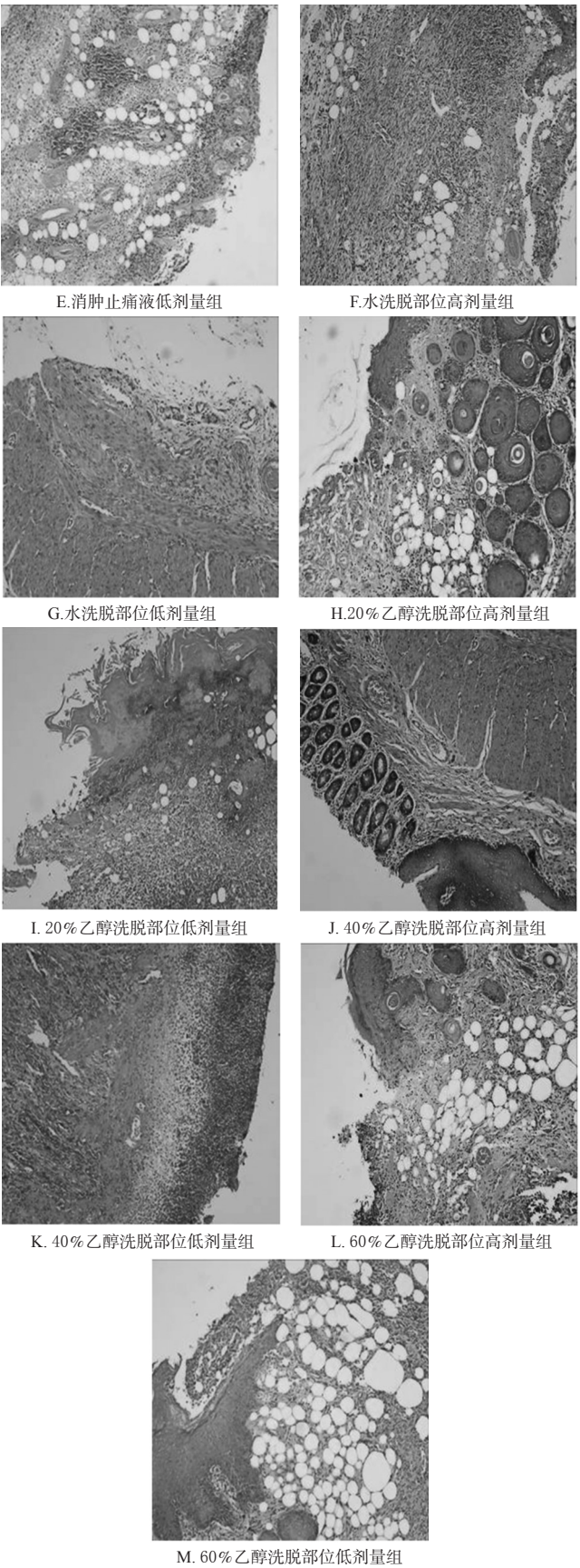
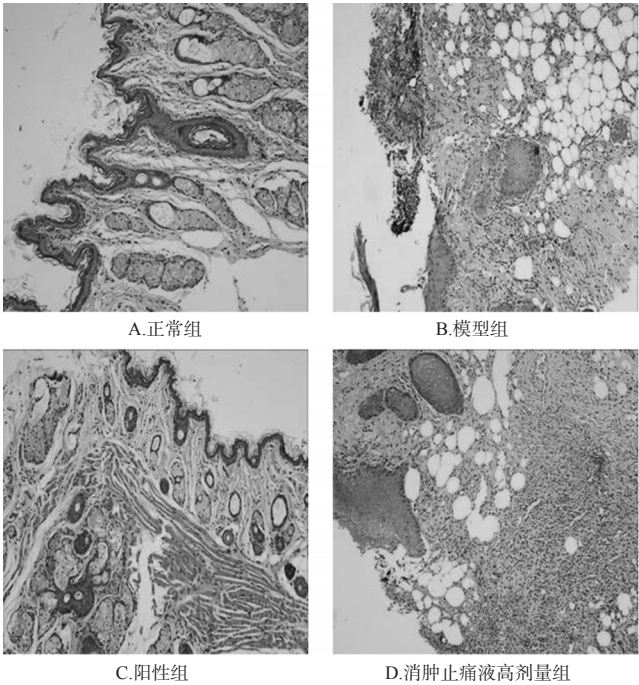


图1 各组大鼠肛周局部黏膜组织 HE 染色病理切片图 (×100)
Fig 1 HE staining pathological sections of local mucosa around the anus of rats in each group (×100)

与正常组比较,模型组大鼠痔疮局部组织黏膜病理评分显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,阳性组、40%乙醇洗脱部位高剂量组和低剂量组以及60%乙醇洗脱部位高剂量组大鼠痔疮局部组织黏膜病理评分显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),提示40%、60%乙醇洗脱部位可能为消肿止痛液的有效部位。各组大鼠肛周局部黏膜组织病理观察评分结果见表2。

表2 各组大鼠肛周局部黏膜组织病理观察评分结果
Tab 2 Histopathological score of local mucosa around the anus of rats in each group

组别	每只大鼠评分								总评分
	1	2	3	4	5	6	7	8	
正常组	0	0	0	0	0	0	0	0	0
模型组	3	2	3	3	2	3	2	3	21**
阳性组	2	1	2	1	1	0	1	1	9##
消肿止痛液高剂量组	3	2	2	3	2	3	1	2	19
消肿止痛液低剂量组	3	2	1	2	3	2	2	3	18
水洗脱部位高剂量组	3	3	2	3	2	1	2	3	19
水洗脱部位低剂量组	2	3	2	2	1	3	2	2	17
20%乙醇洗脱部位高剂量组	2	2	2	3	1	2	2	2	16
20%乙醇洗脱部位低剂量组	2	2	1	3	3	2	2	2	17
40%乙醇洗脱部位高剂量组	2	1	1	2	1	1	2	3	13##
40%乙醇洗脱部位低剂量组	2	2	2	1	2	2	2	1	14##
60%乙醇洗脱部位高剂量组	2	2	2	2	1	2	2	2	15#
60%乙醇洗脱部位低剂量组	3	2	3	2	1	3	1	2	17

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$
Note: vs. normal group, ** $P<0.01$; vs. model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

3.2 醋酸致小鼠扭体反应实验结果

与模型组比较,阳性组、20%乙醇洗脱部位高剂量组、40%乙醇洗脱部位高剂量组和低剂量组以及60%乙醇洗脱部位高剂量组小鼠的扭体潜伏时间均显著延长,15 min内扭体次数均显著减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$),这提示消肿止痛液20%、40%、60%乙醇洗脱部位对醋酸所致小鼠疼痛有一定抑制作用。各组小鼠扭体潜伏时间、15 min扭体次数测定结果见表3。

3.3 小鼠热板实验结果

与给药前比较,阳性组、消肿止痛液高剂量组、20%乙醇洗脱部位高剂量组以及40%乙醇洗脱部位高、低剂量组小鼠给药后痛阈值均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。给药后,与模型组比较,阳性组和40%乙醇洗脱部位高、低剂量组小鼠给药后的痛阈值明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。这提示给药后消肿止痛液、20%和40%乙醇洗脱部位对热刺激引起的疼痛具有镇痛作用。各组小鼠痛阈值测定结果见表4。

4 讨论

痔疮是临床常见多发的肛肠疾病,俗有“十人九痔”之称。祖国医学认为,风、湿、热凝结于肛门,导致气血壅滞、宿积不散、经络交错,终发为痔^[14]。宁夏回族自治区

表3 各组小鼠扭体潜伏时间、15 min内扭体次数测定结果($\bar{x}\pm s,n=10$)

Tab 3 Writhing latency time and 15 min writhing times of mice in each group($\bar{x}\pm s,n=10$)

组别	扭体潜伏时间,s	15 min扭体次数	镇痛率,%
模型组	170.80±30.46	34.60±5.48	
阳性组	290.90±38.05##	22.10±3.90##	36.13
消肿止痛液高剂量组	193.10±18.43	32.50±5.48	6.07
消肿止痛液低剂量组	190.20±20.88	32.60±6.50	5.78
水洗脱部位高剂量组	177.10±22.29	33.10±5.59	4.34
水洗脱部位低剂量组	183.20±14.70	32.30±3.95	6.65
20%乙醇洗脱部位高剂量组	205.70±17.52#	28.50±6.15	17.63
20%乙醇洗脱部位低剂量组	196.30±22.31	29.60±4.58	14.45
40%乙醇洗脱部位高剂量组	284.10±35.28##	24.70±4.42##	28.61
40%乙醇洗脱部位低剂量组	232.40±18.55##	26.10±4.18##	24.57
60%乙醇洗脱部位高剂量组	209.40±23.83##	27.30±7.92#	21.10
60%乙醇洗脱部位低剂量组	196.90±18.75	29.70±5.87	14.16

注:与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$
Note: vs. model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

表4 各组小鼠痛阈值测定结果($\bar{x}\pm s,n=10$)
Tab 4 Pain threshold of mice in each group($\bar{x}\pm s,n=10$)

组别	给药前痛阈值,s	给药后痛阈值,s	痛阈提高百分率,%
模型组	15.75±2.86	15.95±3.79	1.59
阳性组	15.82±2.96	20.86±2.74***	34.50
消肿止痛液高剂量组	15.74±3.77	18.65±2.49*	23.69
消肿止痛液低剂量组	16.24±3.43	18.80±2.79	18.89
水洗脱部位高剂量组	15.50±3.82	18.24±1.73	22.75
水洗脱部位低剂量组	16.15±2.72	17.51±2.02	10.71
20%乙醇洗脱部位高剂量组	16.56±3.97	19.32±3.08*	24.78
20%乙醇洗脱部位低剂量组	16.41±4.06	18.93±2.52	19.87
40%乙醇洗脱部位高剂量组	15.89±2.71	20.04±2.79***	27.47
40%乙醇洗脱部位低剂量组	16.02±3.67	19.52±2.47**	25.94
60%乙醇洗脱部位高剂量组	16.74±3.51	18.33±2.05	14.73
60%乙醇洗脱部位低剂量组	16.56±2.51	17.50±3.80	8.65

注:与同组给药前比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$
Note: vs. the same group before administration, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

区地处西北,由于地域特点及风土人情因素,多数居民擅饮酒、喜食牛羊肉及辛辣厚腻之品,故痔疮发病率较高,达40.06%^[15]。我院医院制剂消肿止痛液在临床使用中效果良好,将消肿止痛液有效部位开发为软膏制剂是临床所需,也是医院制剂和创新药物发展的方向^[16]。

本课题组采用D101大孔树脂对消肿止痛液进行有效部位富集,其原因是在前期文献调研中对该处方中主要药味黄柏^[17]、大黄^[18]、五倍子^[19]等均有采用D101大孔树脂进行成分富集的相关研究。马应龙麝香痔疮膏具有清热燥湿、活血消肿、去腐生肌的功效,临床效果较好,故以其作为本研究的阳性药^[20]。

在进行醋酸致大鼠肛周溃疡的正式实验前,笔者先采用贴敷法和肛周注射法进行预实验,发现贴敷法造模

效果不佳,且变异性较大;而肛周注射法造模较为稳定,并对注射剂量进行了筛选,分别用75%冰醋酸以每只0.05 mL和每只0.1 mL的剂量造模,结果按每只0.1 mL剂量造模溃疡面积过大,而按每只0.05 mL剂量造模溃疡面积适合,同时应注意注射肛周位置相同,以减少模型间的差异。在制备各部位含药软膏时,若药物不溶于水,先加少量聚山梨酯80助溶,再加蒸馏水溶解作为水相制备软膏。在制备消肿止痛液给药组含药软膏时,软膏药物浓度较大,给药后不易吸收,在一定程度上影响了疗效。

在醋酸致大鼠肛周溃疡实验中,痔疮局部症状评分的结果表明,20%、40%和60%乙醇洗脱部位均能改善醋酸致大鼠肛周溃疡症状;观察痔疮局部黏膜组织的病理结果表明,40%和60%乙醇洗脱部位能改善醋酸致大鼠肛周溃疡的病理变化。可见,40%和60%乙醇洗脱部位具有较好的消肿、促溃疡面愈合作用。在醋酸致小鼠扭体实验中,20%、40%和60%乙醇洗脱部位均有一定的镇痛作用。在小鼠热板实验中,消肿止痛液、20%和40%乙醇洗脱部位对热刺激引起的疼痛具有镇痛作用。根据该研究药效结果,确定40%乙醇洗脱部位为消肿止痛液有效部位,具有消肿、促溃疡面愈合、镇痛的作用。关于高剂量20%乙醇洗脱部位也有一定镇痛作用,高剂量60%乙醇洗脱部位也有一定的消肿、促溃疡面愈合作用,可能原因是这两个部位的化学成分与40%乙醇洗脱部位有一定重叠,尤其是60%乙醇洗脱部位,并且经笔者后期通过超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS)技术检测这3个部位化学成分后,初步得到了验证。

综上,本研究首先通过药效实验最终确定了40%乙醇洗脱部位为消肿、促溃疡面愈合和镇痛的有效部位,后期笔者将继续对该部位化学成分进行研究,以确定其药效物质基础,并将其二次开发为软膏制剂。

参考文献

[1] 余军,范嫻嫻.消肿止痛液治疗肛肠疾病术后疼痛水肿60例疗效观察[J].河北中医,2012,34(10):1474-1475.
[2] 黄燕秋,谢志茹,朴胜华,等.大孔吸附树脂在中药纯化中的应用进展[J].广东化工,2018,45(8):130-132.
[3] 苗明三,张梦飞,田硕.中药痔疮动物模型制备规范(草案)起草说明[J].中药药理与临床,2017,33(5):212-215.
[4] 白明,刘丹丹,缪君娴,等.不同品种大黄油糊外用抗炎作

用及对大鼠皮肤溃疡、痔疮模型的影响[J].中国现代应用药学,2013,30(6):575-581.

[5] 张雪琴.四黄痔疮膏对大鼠痔相近动物模型的影响及作用机制研究[D].昆明:云南中医学院,2015.
[6] 王银洁,刘本臣,刘军,等.消肿止痛液有效部位软膏的制备工艺及其质量标准研究[J].中国民族民间医药,2018,27(19):21-25.
[7] 郭坤坤,许良葵,王小明,等.鼠妇有效部位镇痛的药效学研究[J].中药药理与临床,2018,34(1):36-40.
[8] 黄华利,李娟,何海霞,等.五味痔疮胶囊的镇痛、止血、通便和抗菌作用研究[J].中国药房,2014,25(43):4056-4059.
[9] 王彤,梁月琴,王崇静,等.龙血竭 β -环糊精凝胶剂的药效学研究[J].中国医院药学杂志,2017,37(1):9-12.
[10] 李凤金,王博,霍金海,等.桉椰子醇提取物对小鼠/大鼠的镇痛、抗炎作用[J].中国药房,2019,30(1):59-63.
[11] 倪力军,颜玮韬,张立国,等.中药有效部位组方通痹四味方的体内抗炎、镇痛及活血通络等药效评价[J].中药新药与临床药理,2016,27(5):666-671.
[12] 刘丽,刘志辉,朱萱萱,等.清肠化湿方抗炎与镇痛的药效学实验研究[J].时珍国医国药,2016,27(7):1596-1598.
[13] 鲁兵,刘玉祥,陈勇,等.急性嵌顿性混合痔的病理形态特征[J].军医进修学院学报,2010,31(3):251-257.
[14] 张慧,史圣华,莫日根,等.痔病发病原因的总结与分析[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(5):43-44.
[15] 刘蔚,王继宁,张小元,等.我国西北地区成人常见肛肠疾病流行病学调查及相关因素分析[J].实用预防医学,2017,24(3):333-336.
[16] 柯敏,李居怡,刘新国,等.中药复方有效部位群与创新药物的研究[J].时珍国医国药,2013,24(4):920-922.
[17] 罗鸿,黄柏中黄柏碱的提取纯化工艺研究[D].成都:西南交通大学,2014.
[18] 孙艳平,汪兴军,闫平,等.D101大孔树脂纯化大黄蒽醌组分的工艺研究[J].化工管理,2015(24):174-175.
[19] 廖格,邵元元,熊硕,等.柱色谱分离纯化五倍子没食子酸[J].中国食品学报,2015,15(7):131-138.
[20] 杨丹丹,冯群虎.马应龙麝香痔疮膏的临床应用[J].中西医结合心血管病电子杂志,2018,6(19):32-34.

(收稿日期:2019-03-02 修回日期:2019-04-19)

(编辑:林 静)