

银芷肛肠熏洗剂对痔组织细胞因子 VEGF、CD68 及 MMP9 的影响*

杨 阳, 宫 毅[△], 马建国

(云南中医学院第一附属医院, 云南 昆明 650021)

摘要:目的 观察银芷肛肠熏洗剂对痔组织 VEGF、CD68、MMP9 的影响。方法 选取痔急性发作期患者 40 例, 随机分为治疗组和对照组各 20 例。治疗组予银芷肛肠熏洗剂, 对照组予金玄痔科熏洗散, 肛门局部熏洗连续治疗后 7d, 取痔组织进行免疫组化染色检查, 并与未用药直接手术痔患者(空白组)的组织进行对比, 观察药物对痔组织 VEGF、CD68、MMP9 的影响。结果 给药后银芷肛肠熏洗剂治疗组及金玄痔科熏洗散对照组抑制 VEGF、CD68、MMP9 表达的作用均优于空白组($P<0.01$); 银芷肛肠熏洗剂抑制 VEGF、CD68、MMP9 的作用优于金玄痔科熏洗散对照组($P<0.01/0.05$)。结论 银芷肛肠熏洗剂能抑制痔组织 VEGF、CD68、MMP9 的表达, 其对痔的治疗作用可能与抑制 VEGF、CD68、MMP9 表达有关。

关键词: 银芷肛肠熏洗剂; 痔组织; 细胞因子; 血管内皮生长因子; CD68; 基质金属蛋白酶 9

中图分类号: R285.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2015)03-0043-04

银芷肛肠熏洗剂治疗痔急性发作在临床上具有满意的效果。现代研究发现, 一些细胞因子在痔的发病机制中发挥着重要作用, 为进一步证实银芷肛肠熏洗剂治疗痔的临床疗效, 我们特进行其对痔组织细胞因子 VEGF、CD68 及 MMP9 的影响的临床观察, 现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

40 例患者均来源于云南省中医医院肛肠科, 符合 2000 年中华医学会外科分会肛肠学组制定的痔疮诊断暂行标准^[1]。外痔、内痔、混合痔急性发作期 4d 内, 以疼痛、便血、水肿、粘膜改变为主症的患者, 排除器质性病变如直肠息肉、直肠恶性肿瘤或肠道感染性疾病, 按随机数字表随机分为 2 组。治疗组 20 例, 男性 9 例, 女性 11 例; 年龄 18~60 岁, 平均 42.2 岁。对照组 20 例, 男性 7 例, 女性 13 例; 年龄 19~59 岁, 平均 43.7 岁。其中, 治疗组混合痔 7 例, 炎性混合痔 5 例, 内痔 5 例, 血栓外痔 3 例; 对照组混合痔 7 例, 炎性混合痔 3 例, 内痔 6 例, 血栓外痔 4 例。2 组的性别、年龄、基础症状、体征等差异均无统计学意义($P>0.05$), 具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法

治疗组予银芷肛肠熏洗剂, 由云南省中医医院制剂中心提供, 批号: 201207。对照组予马应龙金玄痔科熏洗散, 由武汉马应龙药业集团股份有限公司生产, 批准文号: 国药准字 Z20120018。治疗组将银芷肛肠熏洗剂 60g/次溶入 2 000mL 开水中, 塑料盆置于特制的熏蒸专用椅内, 放置塑料盆处封闭, 仅椅面上方留有坐便孔, 底部放置塑料盆, 高度以肛门距药液面 10cm 处熏蒸为宜, 边熏蒸边收缩肛门训练肛提肌, 待药液凉至 40℃左右时, 将臀部浸入药液内坐浴。对照组将马应龙金玄痔科熏洗散 55g/次溶入 2 000mL 开水中, 依上法行熏洗治疗。

1.2.2 免疫组化染色方法

银芷肛肠熏洗剂及金玄痔科熏洗散组治疗后 7d 切取痔组织, 以上各组切取的痔组织固定于 10% 中性缓冲福尔马林液中, 脱水、石蜡包埋、连续切片、免疫组化染色后分析阳性率。另外, 选取痔患者未用药直接手术者 20 例切取痔组织作为空白组进行对比。VEGF 血管内皮生长因子多克隆抗体、CD68 巨噬细胞单克隆抗体、MMP9 基质金属蛋白酶

* 基金项目: 云南省教育厅科学研究基金重点项目(2012Z003)

收稿日期: 2015-03-30

作者简介: 杨阳(1979-), 女, 云南瑞丽人, 硕士, 主治医师, 主要从事肛肠疾病的诊治和研究工作。

[△]通信作者: 宫毅, E-mail: gongyi1797@126.com

9 单克隆抗体均由福州迈新生物技术开发有限公司提供。免疫组化基本方法为 60℃烤片,二甲苯脱石蜡至水,水化后用 PBS(PH7.4)冲洗 3 次,每次 3min(3×3'),根据每一种抗体要求对组织进行相应修复,有必要时每张切片加 1 滴 3%的 H₂O₂,室温下孵育 10min,以阻断内源性过氧化物酶的活性,染色方法按试剂盒说明书在专业实验人员的指导下进行。

1.3 结果分析

VEGF、CD68、MMP9 表达均为细胞浆着色,以出现棕黄色颗粒为阳性。选取每张切片中阳性细胞最集中区域,随机取互不重叠的 5 个 20 倍视野,用数码分析系统 Motic Med 6.0(免疫组化自动分析)分别计算不同视野的阳性细胞率,取平均数进行对比。并参考 Takahashi Y 评分标准^[2]进行评分(见表 1),比较各组的差异有无统计学意义。

表 1 免疫组化阳性率评分

计分	阳性细胞率(%)
1	<25
2	≥25~50
3	≥50~75
4	≥75

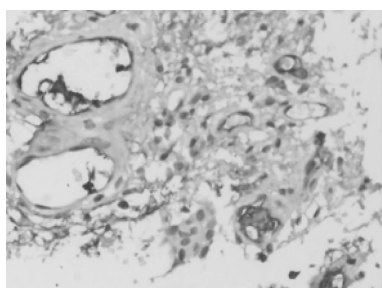


图 1 空白组 VEGF(X20)

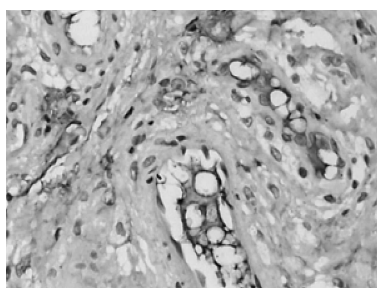


图 2 金玄痔科熏洗散组 VEGF(X20)

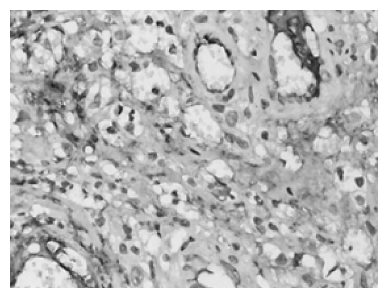


图 3 银芷肛肠熏洗剂组 VEGF(X20)

2.2 痔组织中 CD68 的阳性表达

痔组织 CD68 染色结果显示:各组患者痔组织中均有 CD68 的阳性表达,按照评分标准评分后结果显示,银芷肛肠熏洗剂治疗组及金玄痔科熏洗散

表 3 3 组痔患者组织 CD68 染色结果的比较

组别	n	阳性率评分($\bar{x} \pm s$)
空白组	20	3.47±0.51
金玄痔科熏洗散对照组	20	2.37±0.85**
银芷肛肠熏洗剂治疗组	20	1.75±0.45**/△△

注:*/** 与空白组比较有统计学意义 ($P<0.05/0.01$);
△/△△与对照组比较有统计学意义 ($P<0.05/0.01$)

1.4 统计学方法

统计学方法采用 SPSS17.0 统计软件,各组的计量资料将采用均数±标准差统计描述,2 组间计量资料用独立样本 t 检验,计数资料用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 痔组织中 VEGF 的阳性表达

痔组织 VEGF 染色结果显示:各组患者痔组织中均有 VEGF 的阳性表达,按照结果分析方法计算阳性细胞率按评分标准评分。结果显示,银芷肛肠熏洗剂治疗组及金玄痔科熏洗散对照组抑制 VEGF 表达的作用均优于空白组 ($P<0.01$),差异均有统计学意义;银芷肛肠熏洗剂治疗组抑制 VEGF 表达的作用明显优于金玄痔科熏洗散对照组, ($P<0.01$),差异有统计学意义。见图 1-3、表 2。

表 2 3 组痔患者组织 VEGF 染色结果的评分比较

组别	n	阳性率评分($\bar{x} \pm s$)
空白组	20	3.72±0.57
金玄痔科熏洗散对照组	20	2.77±0.71**
银芷肛肠熏洗剂治疗组	20	1.89±0.32**/△△

注:*/** 与空白组比较有统计学意义 ($P<0.05/0.01$);
△/△△与对照组比较有统计学意义 ($P<0.05/0.01$)

对照组抑制 CD68 表达的作用均优于空白组 ($P<0.01$),差异均有统计学意义;银芷肛肠熏洗剂治疗组抑制 CD68 表达的作用优于金玄痔科熏洗散对照组 ($P<0.05$),差异有统计学意义。见图 4-6、表 3。

2.3 痔组织中 MMP9 的阳性表达

痔组织 MMP9 染色结果显示:各组患者痔组织中均有 MMP9 的阳性表达,按照评分标准评分后结果显示,银芷肛肠熏洗剂治疗组及金玄痔科熏洗散对照组抑制 MMP9 表达的作用均优于空白组 ($P<0.01$),差异均有统计学意义;银芷肛肠熏洗剂治疗组抑制 MMP9 表达的作用优于金玄痔科熏洗散对照组 ($P<0.05$),差异有统计学意义。见图 7-9、表 4。

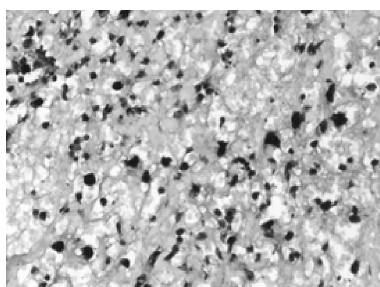


图4 空白组 CD68(X20)

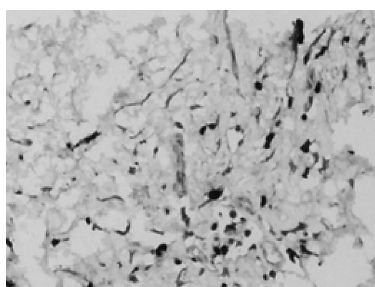


图5 金玄痔科熏洗散组 CD68(X20)

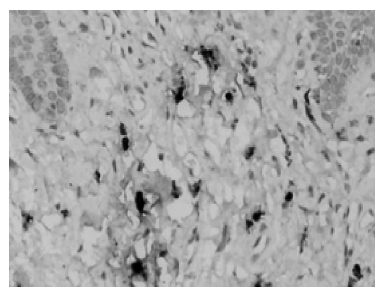


图6 银芷肛肠熏洗剂组 CD68(X20)

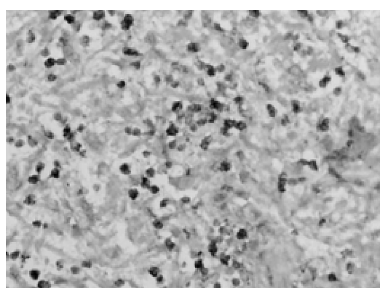


图7 空白组 MMP9(X20)

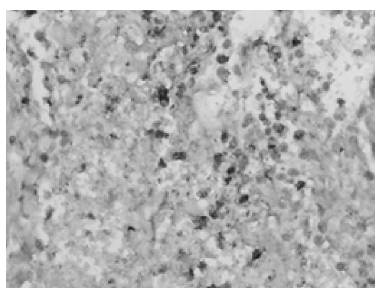


图8 金玄痔科熏洗散组 MMP9(X20)

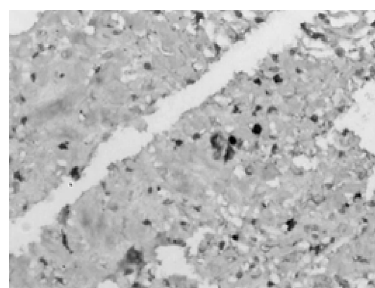


图9 银芷肛肠熏洗剂组 MMP9(X20)

表4 3组痔患者组织 MMP9 染色结果的比较

组别	n	阳性率评分($\bar{x} \pm s$)
空白组	20	3.68±0.62
金玄痔科熏洗散对照组	20	2.42±0.71**
银芷肛肠熏洗剂治疗组	20	1.69±0.86**/△

注:***与空白组比较有统计学意义($P<0.05/0.01$);
△/△△与对照组比较有统计学意义($P<0.05/0.01$)

3 讨论

痔急性发作表现为病变部位的炎症和循环障碍,病理检查也提示痔组织有明显的炎症细胞浸润和毛细血管增生^[3-4]。近年来,利用免疫组织化学染色等方法,有学者开始着手研究痔组织中细胞及分子生物学方面的变化,以更好的阐述痔的发病机制。研究发现,痔的发病机制与反复发生的炎症反应及新生血管生成有关系。资料表明,痔是肛垫组织发生一系列病理改变所引起的,某些炎症、创伤性因素可使各种细胞及细胞因子表达和活性增强^[5],造成微血管壁及内皮细胞的过氧化损伤,进而使肛垫弹性下降,血管通透性增加,引起或加重痔组织的水肿,导致痔出血风险增加,并且导致痔新生血管继续生成,纤维支持结构的进一步破坏,使痔增大和脱出^[6-8],认为痔的形成与 VEGF、CD68、MMP9 等细胞因子的表达增强有着密切的相关性。

痔疮发作期多以“肛门肿痛、便血、滋水、粘膜

溃烂”为主症,辨证以“湿、热、瘀”为主要病机,故治疗时多以清热利湿、消肿止痛、活血祛瘀为治则。痔疮发作重在肛门局部表现而全身症状较轻或无,因此,采用局部治疗即可使药力直达病所,起到明显的治疗作用。中药熏洗是中医局部外治的常用之法。通过熏蒸和坐浴,可使肛门括约肌松弛,皮肤温度升高,毛孔开放,微小血管扩张,血液和淋巴循环加快^[9],有利于炎症介质的吸收。在临床上以经验方银芷肛肠熏洗剂治疗痔急性发作在时效、疗效方面都具有很好的作用^[10],实验研究也发现其可以改善痔相近动物模型的病理学改变^[11]。本方由银花、白芷、昆明山海棠、生大黄、荆芥、生艾叶、细辛、花椒、三棱、莪术组成。方以银花清热解毒,《本草纲目》称其治“一切风湿气,及诸肿毒、痈疽、……诸恶疮,散热解毒”,现代药物研究发现银花具有广谱抗菌作用,并有明显的抗炎及解热作用^[12];白芷活血通络、消肿止痛,《医方摘要方》载用鹅胆汁调白芷末治痔疮肿痛;昆明山海棠及大黄活血化瘀,除湿止痛,现代药物研究发现昆明山海棠有较好的抗炎、免疫调节作用^[13];大黄具有良好的抗炎作用^[14],并能降低肠道氧自由基损害,对肠黏膜起到保护作用^[15];荆芥散风止血消疮,《简便单方》云“治痔漏肿痛,荆芥煮汤,日日洗之”;艾叶、细辛、花椒祛风止血,通络止痛;三棱、莪术散血去瘀,消肿定痛。全方具有清热解毒,活血化瘀,行气去湿,消肿止痛止血之功。方

中应用了芳香走窜、活血化瘀、辛辣温热、生猛峻烈类药物,有加速药物渗透转运以及畅通经气的作用。生猛峻烈类药物如昆明山海棠药效较好,但内服有较强的胃肠道刺激反应,并对生殖系统有影响^[6],外用时既避免了口服给药的副作用,又能刺激穴位,具有较高的安全性。全方组方合理,临床治疗痔急性发作疗效显著。

痔的发病过程中,VEGF、CD68、MMP9 等细胞因子的表达增强,本研究选取以上细胞因子作为观察指标,通过观察银芷肛肠熏洗剂对细胞因子表达的影响,探讨银芷肛肠熏洗剂治疗痔急性发作的作用机制。结果显示,银芷肛肠熏洗剂能抑制痔组织的 VEGF、CD68、MMP9 表达,三者与炎症反应及血管生成均有密切的关系,这表明银芷肛肠熏洗剂具有抑制炎症及血管生成的作用,能有效的改善痔急性发作时的病理改变,这可能是其治疗痔急性发作的作用机制之一。

参考文献:

- [1] 喻德洪,杨新庆,黄延庭. 重新认识提高痔的治疗水平[J]. 中华外科杂志,2000,38(12):890-891.
- [2] Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, matastasis, and proliferation of human coloncancer[J]. Cancer Res, 1995, 55:3964-3968.
- [3] 孙平良,肖振秋,尹雪曼. 嵌顿痔的临床病理研究[J]. 广西中医学院学报,2003,6(1):8-11.
- [4] 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):251-252.
- [5] Woessner JF Jr. The family of matrix metalloproteinases[J]. Ann NY Acad Sci, 1994, 732:11-21.
- [6] 韩炜,王振军,赵博,等. 痔组织弹性纤维退变和血管生成的机制及其意义[J]. 中华胃肠外科杂志,2005,8(1):56-59.
- [7] Pangrazio-kulbersh V, Berger JL, chermak DS, et al. Treatment effects of the mandibular anterior repositioning appliance en patients with Class II malocclusion [J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2003, 123(3):286-295.
- [8] 徐跃军,张瑞莲,吴惠芬,等. 痔疮组织中血管内皮生长因子的表达及意义[J]. 数理医药学杂志 2007, 20(4):461.
- [9] 尚德俊,秦红岩,秦红松. 外科熏洗疗法[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:22.
- [10] 杨阳, 宫毅. 银芷肛肠熏洗剂治疗痔急性发作的临床观察[J]. 云南中医学院学报,2010,33(5):52-54.
- [11] 杨阳, 宫毅. 银芷肛肠熏洗剂对大鼠痔相近模型局部炎症及组织病理学的影响[J]. 云南中医学院学报,2014,37(3):11-14.
- [12] 高学敏. 中药学[M]. 北京:中国中医药出版社,2002.
- [13] 万屏,肖农,朱明华. 昆明山海棠对人单核细胞 TNF- α 、IL-8 及基因表达的影响 [J]. 临床皮肤科杂志,2002,31(1):3-5.
- [14] 李杰,张陆勇. 大黄素的药理学研究近况[J]. 药学进展, 2005,29(12):540.
- [15] 周于新,沈迎春,高萍,等. 生大黄防治新生鼠缺氧肠损伤的初步研究[J]. 中国儿童保健杂志,2007,15(1):57-58.
- [16] 马明福,蔡敏,李练兵. 昆明山海棠诱发人精子与淋巴细胞染色体畸变的比较研究 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2000,24(4):4-6.

(编辑:徐建平)

The Effect of YinZhi Anorectal Smoked Lotion Acting on the Hemorrhoid Tissue Cytokines Factor VEGF、CD68 and MMP9

YANG Yang, GONG Yi[△], MA Jianguo

(The No. 1 Affiliated Hospital of Yunnan University of TCM, Kunming 650021, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe effect of YinZhi anorectal smoked lotion acting on the hemorrhoid tissue cytokines factor VEGF、CD68 and MMP9. **Methods** Selected 40 cases of acute episode of hemorrhoid patients were randomly divided into 20 patients in each treatment group and the control group. The treatment group were cured with YinZhi anorectal smoked lotion and the control group were cured with Ma Ying-Long Jin Xuan hemorrhoid washing powder. All two group were fumigated partially on anal after 7 consecutive days. The hemorrhoid tissue gotten from patients compare with that were cured through surgery directly without medication by immunohistochemical staining examination. Observe the effect of medication on hemorrhoid tissue cytokines factor VEGF、CD68 and MMP9. **Results** After medical treatment, YinZhi anorectal smoked lotion treatment group and Ma Ying-Long Jin Xuan hemorrhoid washing powder control group is better than blank group about inhibiting VEGF, CD68, MMP9 expression ($P < 0.01$); YinZhi anorectal smoked lotion treatment group is better than Ma Ying-Long Jin Xuan hemorrhoid washing powder control group ($P < 0.01/0.05$). **Conclusion** YinZhi anorectal smoked lotion inhibits expression of hemorrhoidal tissue cytokines factor VEGF、CD68 and MMP9. The therapeutical effect of YinZhi anorectal smoked lotion acting on hemorrhoidal tissue is possibly related with expression of inhibiting VEGF, CD68, MMP9.

KEY WORDS: YinZhi anorectal smoked lotion; hemorrhoidal tissue; cytokines factor; VEGF; CD68; MMP9