

梓醇对甲状腺功能亢进小鼠肝脏氧化应激反应的影响

杨鹿鸣, 董士中, 马艳庆

平煤神马医疗集团总医院, 河南 平顶山 467000

[摘要] 目的: 观察梓醇对甲状腺功能亢进小鼠模型肝功能及氧化应激相关指标的影响, 探讨梓醇防治甲状腺功能亢进肝损伤的作用机制。方法: 将40只健康BALB/c雌性小鼠分为空白组、模型组、甲巯咪唑组(西药组)、梓醇组, 每组10只。除空白组外, 其余各组制备甲状腺功能亢进模型, 模型制备成功后, 模型组及空白组给予蒸馏水灌胃, 西药组及梓醇组给予相应的药物灌胃。给药结束后摘眼球取血, 采用酶联免疫吸附法检测血清中促甲状腺激素(TSH)、三碘甲状腺原氨酸(T3)、四碘甲状腺氨酸(T4)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)的含量; 采用比色法检测肝脏组织中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)的活力单位; 生化法得出过氧化氢酶(CAT)含量。结果: 与空白组比较, 模型组小鼠血清TSH含量降低($P<0.05$), 血清T3、T4、AST、ALT、ALP含量及肝脏组织MDA、SOD、CAT含量升高($P<0.05$); 与模型组比较, 梓醇组及西药组小鼠血清TSH含量升高($P<0.05$), 血清T3、T4、AST、ALT、ALP含量及肝脏组织MDA、SOD、CAT含量降低($P<0.05$); 与西药组比较, 梓醇组小鼠血清TSH含量较高($P<0.05$), 血清T3、T4、AST、ALT、ALP含量及肝脏组织MDA、SOD、CAT含量较低($P<0.05$)。结论: 梓醇治疗甲状腺功能亢进的效果优于西药, 更能降低肝脏氧化应激损伤。

[关键词] 甲状腺功能亢进; 梓醇; 肝功能; 氧化应激; 动物实验; 小鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2021) 17-0012-05

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2021.17.003

Effect of Catalpol on Oxidative Stress Response in the Liver of Mice with Hyperthyroidism

YANG Luming, DONG Shizhong, MA Yanqing

Abstract: **Objective:** To observe the effect of catalpol on the liver function and the indexes related to oxidative stress in mice models with hyperthyroidism, and to discuss the mechanism of catalpol on prevention and treatment of hyperthyroidism complicated with the liver injury. **Methods:** A total of 40 healthy BALB/c female mice were divided into the blank group, the model group, the methimazole group(the western medicine group), and the catalpol group, 10 mice in each group. Except for the blank group, the models with hyperthyroidism in the other groups were prepared. After successful establishment, the model group and the blank group were given gastric perfusion with distilled water. The western medicine group and the catalpol group were given gastric perfusion with corresponding medicine. After medication, eyeballs were extracted and blood was drawn. Enzyme-linked immunosorbent assay was applied to detect the contents of thyroid stimulating hormone (TSH), triiodothyronine(T3), Tetraiodothyronine(T4), aspartate transaminase(AST), alanine transaminase(ALT), and alkaline phosphatase(ALP) in serum. Colorimetry was used to detect activity units of malondialdehyde(MDA) and superoxide dismutase (SOD). Biochemistry was used to detect the content of catalase(CAT). **Results:** Compared with those in the blank group, the content of TSH in serum in the model group was decreased($P<0.05$); contents of T3, T4, AST, ALT, and ALP in serum as well as contents of MDA, SOD, and CAT in the liver tissue were increased($P<0.05$). Compared with those in the model group, contents of TSH in serum in the catalpol group and the western medicine group were increased($P<0.05$); contents of T3, T4, AST, ALT, and ALP in serum as well as contents of MDA, SOD, and CAT in the liver tissue were decreased($P<0.05$). Compared with those in the western medicine group, content of TSH in serum in the catalpol group was increased($P<0.05$); contents of T3, T4, AST, ALT, and ALP in serum as well as contents of MDA, SOD, and CAT in the liver tissue

[收稿日期] 2020-01-04

[修回日期] 2021-06-16

[基金项目] 河南省2015年科技发展计划项目 (152102310358)

[作者简介] 杨鹿鸣 (1983-) 女 主治医师, E-mail: sh10698@163.com

were decreased($P < 0.05$). **Conclusion:** Catalpol has a better effect than western medicine in the treatment of hyperthyroidism, which can further relieve oxidative stress injury in the liver.

Keywords: Hyperthyroidism; Catalpol; Liver function; Oxidative stress; Animal experiment; Mice

甲状腺功能亢进是临床最常见的甲状腺疾病之一,其特点是甲状腺激素的产生和分泌不受控制,进入全身循环。过量的甲状腺激素会导致甲状腺激素在组织中发挥不适当的作用,形成一种称为甲状腺中毒的临床状态^[1]。甲状腺中毒的典型表现包括心悸、心动过速、运动时呼吸困难、热耐受不良、震颤和体质量减轻,尽管食欲和摄入量增加。典型症状通常在年轻患者中更为突出,老年患者往往症状较轻,甚至无症状,有时在为其他临床症状寻求医疗帮助时被偶然诊断出来^[2-3]。未经治疗的甲状腺功能亢进可能会导致骨质疏松症、房颤、心力衰竭等并发症的发生,甚至在创伤、感染或手术等应激性突发事件后出现危及生命的甲状腺风暴。梓醇是一种环烯醚萜苷类化合物,分子式为 $C_{15}H_{22}O_{10}$,存在于玄参科植物地黄的根茎及地上部分^[4-5]。梓醇对心肌有正性肌力作用,可促进淋巴细胞转化。有文献报道,梓醇能通过降低甲状腺功能亢进小鼠炎症反应,缓解甲状腺功能亢进小鼠临床症状^[6]。此外,梓醇对哮喘、脑缺血-再灌注实验动物的氧化应激过程有调控作用^[7-8]。本研究设想梓醇能通过调控甲状腺功能亢进动物氧化应激过程而缓解肝功能损伤及临床症状,并通过观察梓醇对甲状腺功能亢进小鼠模型肝功能及氧化应激相关指标的影响,探讨梓醇防治甲状腺功能亢进肝损伤的作用机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选用40只6周龄健康BALB/c雌性小鼠,体质量18 g左右,购自郑州大学动物实验中心,许可证号:SYXK(豫)2019-0002。饲养于平煤神马医疗集团总医院实验动物中心SPF级环境中,环境温度为22~23℃,湿度为30%,每笼5只,12 h/12 h明暗交替,每天更换垫料1次,由专人每周定期消毒。

1.2 实验试剂与仪器 腺病毒 AdCMV-TSHR289、梓醇(中国药品生物制品检定所);甲巯咪唑片(德国默克公司,国药准字H20171155,规格:10 mg×50片/盒);抗小鼠促甲状腺激素(TSH)受体抗体试剂

盒、小鼠三碘甲状腺原氨酸(T3)、四碘甲状腺原氨酸(T4)试剂盒(上海生工生物工程有限公司);谷草转氨酶(AST)试剂盒、谷丙转氨酶(ALT)试剂盒、碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(南京卡米洛生物工程有限公司);丙二醛(MDA)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、过氧化氢酶(CAT)试剂盒(上海语纯生物科技有限公司)。酶标仪、离心机[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];显微镜(日本OLYMPUS公司);组织脱水机、石蜡包埋机、石蜡切片机(深圳市达科为医疗科技有限公司)。

1.3 动物分组、模型制备及给药方法 按照随机原则将小鼠分为空白组、模型组、甲巯咪唑组(西药组)、梓醇组,每组10只。将腺病毒 AdCMV-TSHR289 制备成 1×10^8 PFU/mL滴度后于-80℃冰箱保存,除空白组外,其余各组以该感染滴度于股四头肌肌肉注射,每3周免疫1次,连续免疫3次,制备甲状腺功能亢进模型。模型制备成功第1天起,用0.9%氯化钠溶液溶解甲巯咪唑片配制为1 mg/mL浓度溶液,西药组以10 mL/kg的剂量灌胃;用0.9%氯化钠溶液溶解梓醇配制为1.5 mg/mL浓度溶液,梓醇组以10 mL/kg的剂量灌胃;模型组及空白组灌胃相同剂量的0.9%氯化钠溶液。每天1次,连续给药6周。

1.4 标本采集 各组小鼠给药6周后处死,1%戊巴比妥麻醉小鼠后摘除眼球取血,所取血液以3 000×g离心10 min后分离血清,置于-80℃保存。将左心室剪开,用预冷的0.9%氯化钠溶液进行心脏灌注,快速冲洗,直至右心耳流出的液体变澄清,肝脏颜色呈土黄色,取肝脏组织和甲状腺组织,一部分置于-80℃保存,另一部分于福尔马林中固定,石蜡切片,供后续实验使用。

1.5 各指标检测方法 ①甲状腺功能、肝功能的检测。酶联免疫吸附法检测实验动物血清中TSH、T3、T4、AST、ALT、ALP含量。按照说明书指示配置标准溶液,取小鼠血清,加入配置好的标准溶液与相应抗体,摇匀后37℃孵育60 min,磷酸盐缓冲

溶液(PBS)洗涤3次,加入亲和链霉素-HR,37℃孵育30 min,PBS洗涤3次,加入3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物溶液,37℃孵育10 min,加终止液,紫外分光光度计450 nm波长处检测光密度值。②通过分光光度计,按照说明书中指示步骤,在不同条件下测量出OD值,分别计算出MDA、SOD、CAT含量。③苏木精-伊红(HE)染色法观察实验小鼠甲状腺、肝脏组织病理学变化。取石蜡切片,二甲苯溶液浸泡10 min后,用100%、95%、90%、80%乙醇依次浸泡5 min,脱蜡重复2次,自来水冲洗后二甲苯浸泡2次,每次20 s,后苏木精染液染色5 min,自来水冲洗5 min,冲洗完成后盐酸酒精分化10 s,自来水冲洗10 min,冲洗后伊红染液染色5 min;取出自来水冲洗20 s后,80%、90%、95%、100%乙醇依次浸泡5 min,重复2次,封片,于普通光学显微镜下观察。

1.6 统计学方法 用SPSS24.0统计学软件分析处理

实验数据,数据资料用($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠甲状腺组织与肝脏组织病理观察结果比较 见图1。空白组甲状腺滤泡上皮细胞排列整齐,滤泡充满胶质,滤泡间质无充血;模型组甲状腺增生改变,滤泡体积明显增大,大小不规则,滤泡间有血管浸润;西药组小鼠甲状腺上皮细胞水肿,部分滤泡内胶质浓缩,组织有血管侵犯,伴随少量炎性浸润;梓醇组可见甲状腺上皮细胞增生,滤泡形态呈圆形或椭圆形,组织有少量炎细胞浸润。肝脏组织病理观察结果见图2。空白组肝脏组织结构清晰,细胞排列整齐;模型组小鼠肝细胞水肿,少量细胞存在坏死,肝窦扩张,血管瘀血;西药组和梓醇组肝组织结构清晰,部分肝窦扩张,管区及中央静脉区周围可见中性粒细胞浸润。

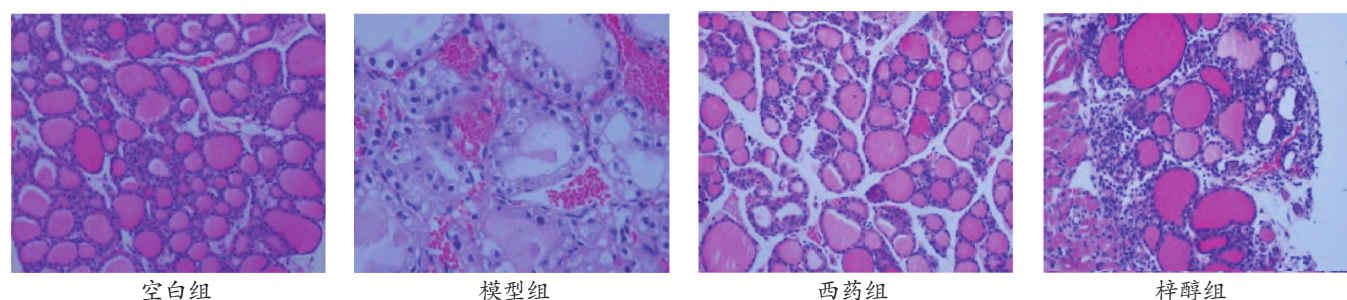


图1 各组小鼠甲状腺组织病理观察结果比较(HE染色,×200)

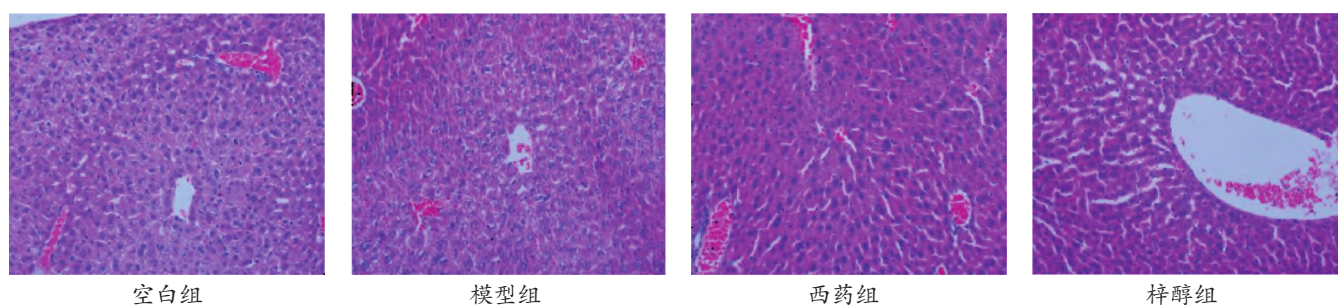


图2 各组小鼠肝脏组织病理观察结果比较(HE染色,×200)

2.2 各组小鼠血清TSH、T3、T4检测结果比较 见表1。与空白组比较,模型组小鼠血清TSH含量降低($P < 0.05$),T3、T4含量升高($P < 0.05$);与模型组比较,梓醇组及西药组小鼠血清TSH含量升高($P < 0.05$),T3、T4含量降低($P < 0.05$);与西药

组比较,梓醇组小鼠血清TSH含量较高($P < 0.05$),T3、T4含量较低($P < 0.05$)。

2.3 各组小鼠血清AST、ALT、ALP检测结果比较 见表2。与空白组比较,模型组小鼠血清AST、ALT、ALP含量升高($P < 0.05$);与模型组比较,梓

醇组及西药组小鼠血清 AST、ALT、ALP 含量降低($P<0.05$);与西药组比较,梓醇组小鼠血清 AST、ALT、ALP 含量较低($P<0.05$)。

表 1 各组小鼠血清 TSH、T3、T4 检测结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	TSH($\mu\text{U/mL}$)	T3(mg/mL)	T4(ng/mL)
空白组	10	16.43 $\pm$ 4.01	3.19 $\pm$ 0.42	45.02 $\pm$ 3.34
模型组	10	6.42 $\pm$ 1.32 ^①	7.31 $\pm$ 1.02 ^①	71.31 $\pm$ 9.34 ^①
西药组	10	14.00 $\pm$ 2.12 ^②	4.22 $\pm$ 1.21 ^②	47.01 $\pm$ 6.33 ^②
梓醇组	10	15.94 $\pm$ 3.10 ^{②③}	3.52 $\pm$ 0.89 ^{②③}	46.21 $\pm$ 7.03 ^{②③}

注:①与空白组比较, $P<0.05$;②与模型组比较, $P<0.05$;③与西药组比较, $P<0.05$

表 2 各组小鼠血清 AST、ALT、ALP 检测结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	AST(U/mL)	ALT(U/mL)	ALP(mg/mL)
空白组	10	20.64 $\pm$ 4.85	14.68 $\pm$ 3.24	5.16 $\pm$ 0.43
模型组	10	32.97 $\pm$ 7.63 ^①	25.78 $\pm$ 7.42 ^①	9.28 $\pm$ 3.45 ^①
西药组	10	28.36 $\pm$ 5.24 ^②	20.08 $\pm$ 6.07 ^②	8.78 $\pm$ 2.94 ^②
梓醇组	10	22.17 $\pm$ 4.27 ^{②③}	16.09 $\pm$ 3.56 ^{②③}	6.41 $\pm$ 2.05 ^{②③}

注:①与空白组比较, $P<0.05$;②与模型组比较, $P<0.05$;③与西药组比较, $P<0.05$

2.4 各组小鼠肝脏组织 MDA、SOD、CAT 检测结果比较 见表 3。与空白组比较,模型组小鼠肝脏组织 MDA、SOD、CAT 含量升高($P<0.05$);与模型组比较,西药组及梓醇组小鼠肝脏组织 MDA、SOD、CAT 含量降低($P<0.05$);与西药组比较,梓醇组小鼠肝脏组织 MDA、SOD、CAT 含量较低($P<0.05$)。

表 3 各组小鼠肝脏组织 MDA、SOD、CAT 检测结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	MDA(nmol/g)	SOD(U/g)	CAT(U/g)
空白组	10	113.29 $\pm$ 13.58	1 332.56 $\pm$ 92.46	1 265.32 $\pm$ 97.58
模型组	10	171.23 $\pm$ 17.04 ^①	1 994.39 $\pm$ 118.21 ^①	1 746.53 $\pm$ 178.69 ^①
西药组	10	148.24 $\pm$ 24.35 ^②	1 732.48 $\pm$ 126.16 ^②	1 453.25 $\pm$ 182.94 ^②
梓醇组	10	116.36 $\pm$ 12.19 ^{②③}	1 354.67 $\pm$ 48.96 ^{②③}	1 237.59 $\pm$ 96.85 ^{②③}

注:①与空白组比较, $P<0.05$;②与模型组比较, $P<0.05$;③与西药组比较, $P<0.05$

3 讨论

甲状腺功能亢进的诊断通常以临床症状和(或)甲状腺中毒的体征为依据,经生化检查证实,T3、游离 T4 水平升高,TSH 水平下降^[9-10]。目前甲状腺功能亢进的治疗方法包括使用抗甲状腺药物(ATDs)治疗、甲状腺手术治疗和放射碘(I-131)放疗。ATDs 的作用主要是抑制毒性弥漫性甲状腺肿(GD)中甲状腺

激素的产生,可能是免疫调节^[11-12]。甲状腺切除和 I-131 均为消融治疗,其治疗效果是永久性切除或破坏过活跃的甲状腺组织。临床常用的 ATDs 有甲硫咪唑或卡咪唑(服用后在体内转化为甲硫咪唑)及丙基硫脲嘧啶(PTU)2 种^[13-14]。对于甲状腺功能亢进症恶化导致并发症风险增加的患者,建议考虑在放射性碘之前进行甲硫咪唑预处理^[15-16]。如果选择甲状腺切除术治疗 GD,应尽可能在术前将患者甲状腺功能恢复正常。甲状腺功能亢进常合并原发性胆汁性肝硬化,临床可导致 ALP、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)升高,但骨代谢异常也可引起 ALP 升高,这在一定程度上削弱了其评价肝功能异常的可靠性^[17]。

地黄所含梓醇均能降低四氧嘧啶、链脲佐菌素诱导的小鼠、大鼠糖尿病模型血糖、血脂水平,改善糖耐量^[18]。地塞米松诱导 3T3-L1 脂肪细胞建立胰岛素抵抗(IR)细胞模型,经梓醇干预后,3T3-L1 脂肪细胞培养液中葡萄糖消耗量增加。梓醇可提高葡萄糖转运子 4(Glut4)的蛋白表达,提示梓醇改善 IR 可能与直接促进葡萄糖摄取和转运有关。梓醇能促进肝糖原合成,提高葡萄糖利用度^[19]。梓醇对甲状腺功能亢进型阴虚大鼠的实验表明,梓醇不仅能改善阴虚症状,并能调节异常的甲状腺激素水平^[6]。本研究显示,模型组 AST、ALT、ALP、MDA、SOD、CAT 均高于空白组,而梓醇组及西药组 AST、ALT、ALP、MDA、SOD、CAT 均低于模型组,且梓醇组以上各指标均低于西药组,提示梓醇能降低肝损伤及氧化应激反应,且效果优于西药组。

【参考文献】

- [1] 杜敏群,胡卓清,崔燎. 甲状腺素及促甲状腺素对骨转换作用机制的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(2): 259-260.
- [2] SAYED M S J, FARSHAD S, MEHDI V, et al. Epidemiology of hyperthyroidism in Iran: a systematic review and meta-analysis[J]. J Diabetes Metab Disord, 2018, 17(2): 345-355.
- [3] HELENA R, KATHRIN E, SEBASTIAN H G, et al. Sex-specific phenotypes of hyperthyroidism and hypothyroidism in aged mice[J]. Biology of Sex Differences, 2017, 8(1): 87-88.
- [4] RAYANE B T, TATIANE E B, CARLA C D E A, et al. Decreased PGC1- α levels and increased apoptotic protein signaling are associated with the maladaptive cardiac hypertrophy in hyperthyroidism[J]. Journal of Biosciences, 2018, 43(5): 109-112.
- [5] 汤丹丹,张焦,王帆,等. HPLC-MS/MS法同时测定小鼠生物样

- 品中葛根素和梓醇的浓度[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(9): 1596-1600.
- [6] 张凡, 雷瑜, 邵一丹, 等. 梓醇对甲状腺功能亢进症大鼠的甲状腺相关指标和细胞因子的影响[J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(4): 81-85.
- [7] 刘嘉研, 李俊峰, 车楠, 等. 梓醇对哮喘小鼠气道炎症及 AMPK/ROS/NF- κ B 信号通路的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2019, 54(6): 823-827.
- [8] 黄韬, 孙静波, 樊硕, 等. 梓醇对脑缺血-再灌注大鼠神经功能、氧化应激和炎症反应的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 18(9): 897-901.
- [9] 智红叶, 徐宏燕, 陈瑛瑛, 等. 基因敲入小鼠甲亢性低钾型周期性麻痹模型的评价[J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(4): 369-370.
- [10] 张敏, 聂鑫, 董建一, 等. 甲状腺激素对 Ras 癌基因诱导的肝肿瘤抑制作用研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 22(20): 159-160.
- [11] SEGOE S, SADA K E, HAYASHI K, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibody- positive familial Mediterranean fever and hyperthyroidism: A case report[J]. Medicine, 2018, 97(51): 45-46.
- [12] TU R S, SHEN H F, ZHU Q C, et al. A retrospective analysis of 1,231 patients with anemia after surgical treatment of hyperthyroidism[J]. Experimental and therapeutic medicine, 2018, 16(6): 29-30.
- [13] 李青穆, 魏军平, 李敏, 等. 甲亢宁胶囊对 Graves 病小鼠甲状腺功能及 Akt/mTOR 信号通路的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(9): 111-112.
- [14] 雷珊珊, 吕圭源, 金泽武, 等. 铁皮石斛花提取物对甲亢型阴虚小鼠的影响[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(9): 173-175.
- [15] CLAUSEN C T, HASLE H, HOLMQVIST A S, et al. Hyperthyroidism as a late effect in childhood cancer survivors- an Adult Life after Childhood Cancer in Scandinavia (ALiCCS) study[J]. Acta Oncologica, 2018, 18(4): 457-458.
- [16] HWANG J H, KANG S Y, KANG A N, et al. MOK, a pharmacopuncture medicine, regulates thyroid dysfunction in L-thyroxine- induced hyperthyroidism in rats through the regulation of oxidation and the TRPV1 ion channel[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2017, 17(1): 198-200.
- [17] 荣立新, 鲁爽, 刘咏梅. 北沙参多糖对甲亢型阴虚小鼠的免疫调节作用[J]. 中国中医基础医学杂志, 2013, 19(6): 640-641.
- [18] 杜宗攀, 杨涛, 康越之, 等. 梓醇配伍大黄酸对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠大脑内髓鞘碱性蛋白的影响[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(3): 898-900.
- [19] ZHOU J, GANG X, SHUAI M, et al. Catalpol ameliorates high-fat diet-induced insulin resistance and adipose tissue inflammation by suppressing the JNK and NF- κ B pathways[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 467(4): 853-858.

(责任编辑: 冯天保, 钟志敏)