

理气消瘿片治疗实验性大鼠甲状腺肿的作用机制

王桂红¹, 泮剑英², 王瑞², 田先翔², 鲁云², 郑国华^{2*}

(1. 湖北中医药大学国医堂, 武汉 430061; 2. 湖北中医药大学药学院, 武汉 430065)

[摘要] **目的:**探讨理气消瘿片对实验性大鼠甲状腺肿的作用机制。**方法:**白色封闭群大鼠(SD),随机分为6组:正常对照组,模型组,理气消瘿片低、中、高剂量组,优甲乐组。除正常对照组外,其余各组每日给大鼠灌服丙基硫氧嘧啶(20 mg·kg⁻¹)连续造模,理气消瘿片低、中、高剂量组同时分别灌服2.4,4.8,9.6 g·kg⁻¹的理气消瘿片水溶液,阳性药物组同时灌以7.8 μg·kg⁻¹的优甲乐。60 d后处死动物,留取血清和甲状腺组织。计算大鼠甲状腺指数,检测血清游离三碘甲状腺氨酸原氨酸(FT₃),游离甲状腺素(FT₄),促甲状腺素(TSH)含量,观察甲状腺组织病理改变,利用免疫荧光法观察甲状腺组织中碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),抗凋亡基因B细胞淋巴瘤/白血病2(Bcl-2),转化生长因子β(TGF-β)的表达改变。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠血清中FT₃,FT₄含量升高(P<0.05),TSH含量降低(P<0.05),甲状腺明显肿大(P<0.01),bFGF,Bcl-2表达明显升高,TGF-β表达明显降低;与模型组相比,理气消瘿片能明显降低甲状腺肿大大鼠的甲状腺指数(P<0.05),但对血清FT₃,FT₄,TSH含量影响不明显,使甲状腺组织病理改变减轻,降低bFGF,Bcl-2表达(P<0.01),升高TGF-β表达(P<0.01)。**结论:**理气消瘿片具有抗甲状腺肿的作用,其机制与调节bFGF,Bcl-2,TGF-β的表达有关。

[关键词] 理气消瘿片; 实验性大鼠甲状腺肿; 免疫荧光; 作用机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0159-05

[doi] 10.11653/syjf2014040159

Mechanism of Liqi Xiaoying Tablet on Goiter of Experimental Rats

WANG Gui-hong¹, PAN Jian-ying², WANG Rui², TIAN Xian-xiang², LU Yun², ZHENG Guo-hua^{2*}

(1. Guoyi Tang, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China;

2. Faculty of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the possible mechanism of Liqi Xiaoying tablet on rat goiter. **Method:** Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into six groups: normal control group, model group, Liqi Xiaoying tablet low, middle and high dose group, euthyrox group. In addition to the normal control group, the rest of the rats in each group were fed daily propylthiouracil (20 mg·kg⁻¹) to establish the model, Liqi Xiaoying tablet low, middle and high dose group were fed simultaneously 2.4, 4.8, 9.6 g·kg⁻¹ of Liqi Xiaoying tablet solution, positive drug group was given 7.8 μg·kg⁻¹ of euthyrox. Sixty days later the animals were sacrificed and serum thyroid tissue specimens were collected. Rat thyroid index calculation, serum free triiodothyronine (FT₃), free thyroxine (FT₄), thyroid-stimulating hormone (TSH) levels, thyroid pathological changes were observed, immunofluorescence staining was used to saasy thyroid tissue basic fibroblast growth factor (bFGF), B cell lymphoma/leukmia-2 (Bcl-2), transforming growth factor beta (TGF-β) expression changed. **Result:** Compared with normal group, in model group, serum FT₃, FT₄ levels increased (P<0.05), TSH decreased (P<0.05), significantly enlarged, thyroid (P<0.01), bFGF, Bcl-2 expression was significantly increased, TGF-β expression

[收稿日期] 20120904(018)

[基金项目] 武汉市科技局科技攻关基金项目(200860423218)

[第一作者] 王桂红,副主任药师,从事中药新制剂与新剂型的研究,Tel:18986026269,E-mail:516654434@qq.com

[通讯作者] * 郑国华,湖北中医医药大学教授,博士生导师,从事中药新制剂与新剂型的研究,Tel:027-62101102,E-mail:zgh1227@sina.com

was significantly decreased. Compared with model group, Liqi Xiaoying tablet could significantly reduce goiter index ($P < 0.05$), but change of serum FT_3 , FT_4 , TSH levels was not obvious, reduced the pathological changes of the thyroid, bFGF, Bcl-2 expression ($P < 0.01$), elevated TGF- β expression ($P < 0.01$). **Conclusion:** Liqi Xiaoying tablet has the role of anti-goiter, its mechanism may be associated with bFGF, Bcl-2, TGF- β .

[**Key words**] Liqi Xiaoying tablet; goiter of experimental rats; immunofluorescence; mechanism

甲状腺结节、桥本氏病、甲状腺囊肿、亚急性甲状腺炎等属于祖国医学“瘰疬”的范畴,绝大部分为良性病变,并伴有不同程度的甲状腺肿,是一种病程较长,复发率高的多发性疾病,可严重影响患者的生活质量。现代医学对甲状腺肿的治疗与控制并不理想,且存在诸多的副反应和一定的复发率。本实验中理气消瘿片是根据瘰疬的病因病机以及治法应用之特点,以青皮、柴胡等具有疏肝解郁、升举阳气之功效的中药为主组成制成的复方制剂,全方共达疏肝理气、化痰消瘿之效^[1]。临床研究表明该复方制剂对痰气交阻型瘰疬有较好疗效,经十余年临床使用深受患者欢迎,其临床总有效率为 92%,具有较大的推广使用价值^[2]。但其作用机制还不是很清楚,故本文利用实验性大鼠甲状腺肿模型,从甲状腺细胞凋亡与增生的角度对理气消瘿片治疗甲状腺肿的作用及其机制进行了初步探讨。

1 材料

1.1 药物 理气消瘿片(湖北中医药大学附属医院制剂室提供,处方由柴胡、猫爪草、土贝母、白芥子、瓜蒌皮、青皮、橘叶、郁金、蜣螂虫组成。批准文号:鄂药制字 Z20111088);丙硫氧嘧啶(上海朝晖药业有限公司,批号 101201);优甲乐(德国默克雪兰诺有限公司,批号 133339);游离三碘甲状腺氨酸原氨酸(FT_3)测定试剂盒、游离甲状腺素(FT_4)测定试剂盒、促甲状腺素测定试剂盒(TSH, Siemens Healthcare Diagnostics Inc,批号 006194, 113033, 114256);荧光一抗碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),转化生长因子 β (TGF- β),抗凋亡基因 B 细胞淋巴瘤/白血病 2(Bcl-2)(abcam,批号 GR24716-13, GR112432-2, GR118914-1);荧光二抗 Bcl-2 和 bFGF 都是 CY3 标记的山羊抗兔、TGF- β 是 CY3 标记的山羊抗小鼠(Jakson,批号 109626, 109626, 110030);牛血清白蛋白(BSA)(罗氏,批号 121E058);4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI),抗荧光淬灭封片剂(碧云天,批号 0803021321, 0603141323)。

1.2 仪器 精密电子天平(FA2104N,上海菁海仪器有限公司),全自动化学发光免疫分析仪(ADVIA

centaur XP,德国西门子),倒置荧光显微镜(NIKON ECLIPSE TI-SR,日本尼康)。

1.3 动物 SD 大鼠 96 只,SPF 级,雌雄各半,雄性体质量 120 ~ 150 g,雌性体质量 100 ~ 120 g,由湖北省实验动物中心提供[动物合格证号 4200600507;动物生产许可证号 SCXK(鄂)2008-005]。饲养于湖北中医药大学实验动物中心,常规饮食饮水,雌雄分笼饲养。

2 方法

2.1 模型制备与分组 96 只大鼠适应性饲养 1 个周后,按体重分层随机分为 6 组,即正常组、模型组、理气消瘿片(低、中、高剂量)组、优甲乐组。参考文献方法^[3-5],结合预实验结果进行。正常对照组大鼠每天灌胃给予生理盐水 2 mL·kg⁻¹,其余各组大鼠每天灌胃给予丙基硫氧嘧啶 20 mg·kg⁻¹。理气消瘿片低、中、高剂量组同时分别灌服 2.4, 4.8, 9.6 g·kg⁻¹理气消瘿片的水溶液,优甲乐组大鼠同时灌以 7.8 μ g·kg⁻¹的优甲乐,连续 60 d。末次给药前 1 d 禁食不禁水,末次给药后 1 h 颈总动脉取血,留取血清备检。

2.2 甲状腺指数测定 迅速钝性剥离甲状腺组织,滤纸吸干水分,精密称重,计算脏器指数(脏器指数 = 脏器质量/体质量),用 4% 多聚甲醛溶液固定。

2.3 化学发光法测定血清 FT_3 , FT_4 , TSH 的浓度 按照试剂盒说明书,采用化学发光法测定血清中 FT_3 , FT_4 , TSH 的浓度。

2.4 甲状腺组织病理检查 按常规进行甲状腺组织固定、脱水、包埋、切片、HE 染色。

2.5 免疫荧光法测定甲状腺组织中 bFGF, Bcl-2 和 TGF- β 的表达 每组随机选取 6 只大鼠甲状腺标本,按常规免疫荧光制片,DAPI 染色,组织切片做完免疫荧光后用抗荧光淬灭封片剂封片后于倒置荧光显微镜下观察。每组内每张片子随机挑选至少 3 个 200 倍视野进行拍照。应用 Image-Pro Plus 6.0 软件对拍摄图片进行分析得出其阳性累积吸光度(IA)。

2.6 统计方法 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有计量资料运用 SPSS 16.0 进行 One-Way ANOVA 分析,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 对大鼠甲状腺指数的影响 与模型组相比,理气消瘿片3个剂量组的大鼠甲状腺指数均显著降低,提示:理气消瘿片有减轻甲状腺肿大的作用。见表1。

表1 理气消瘿片对大鼠甲状腺指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	甲状腺质量 /mg	体重 /g	甲状腺指数 /μg·g ⁻¹
正常	-	29 ± 13	231 ± 18	122 ± 50
模型	-	138 ± 28	202 ± 23	677 ± 124 ¹⁾
理气消瘿片	2.4	138 ± 28	233 ± 17	592 ± 98 ^{1,2)}
	4.8	134 ± 21	227 ± 14	590 ± 94 ^{1,2)}
	9.6	131 ± 25	229 ± 21	575 ± 94 ^{1,2)}
优甲乐	7.8 × 10 ⁻⁶	159 ± 30	272 ± 29	594 ± 82 ^{1,2)}

注:与正常组比较¹⁾P < 0.01;与模型组比较²⁾P < 0.05。

3.2 对大鼠血清 FT₃, FT₄ 和 TSH 的影响 与正常对照组比,模型组 FT₃, FT₄ 明显降低, TSH 明显升高,表明模型成功。与模型组相比,理气消瘿片3个剂量组 FT₃, FT₄ 均有升高趋势, TSH 均有降低趋势,但无显著性差异,优甲乐治疗组 FT₃, FT₄ 明显升高, TSH 明显降低。结果显示:理气消瘿片对甲状腺激素影响不明显。见表2。

表2 理气消瘿片对大鼠的血清 FT₃, FT₄, TSH 的影响($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	FT ₃ /ng·L ⁻¹	FT ₄ /ng·L ⁻¹	TSH /U·mL ⁻¹
正常	-	2.05 ± 0.40	19.09 ± 2.85	0.009 ± 0.003
模型	-	0.44 ± 0.25 ¹⁾	1.32 ± 0.55 ¹⁾	0.31 ± 0.16 ¹⁾
理气消瘿片	2.4	0.46 ± 0.22 ¹⁾	1.57 ± 0.89 ¹⁾	0.21 ± 0.17 ¹⁾
	4.8	0.48 ± 0.29 ¹⁾	1.58 ± 0.32 ¹⁾	0.27 ± 0.22 ¹⁾
	9.6	0.41 ± 0.13 ¹⁾	1.51 ± 0.56 ¹⁾	0.20 ± 0.20 ¹⁾
优甲乐	7.8 × 10 ⁻⁶	1.20 ± 0.19 ¹⁾	21.01 ± 1.73	0.10 ± 0.10 ¹⁾

注:与正常组比较¹⁾P < 0.05。

3.3 对大鼠甲状腺组织病理学结构观察 肉眼观察可见,正常对照组大鼠甲状腺为淡红色扁平状,难见到峡部,模型对照组大鼠甲状腺明显充血肿大,为绛紫色梭锤状,质较硬,峡部明显可见,易与其他组织剥离开来。理气消瘿片3个剂量组颜色较模型组浅,质地较软。

HE染色(图1)可见正常对照组甲状腺滤泡呈圆形或椭圆形,大小均匀一致,上皮细胞呈立方或扁平状,单层围成,形成双层壁,滤泡腔内充满粉红色的胶质,分布均匀;模型组与空白组相比滤泡上皮高度明

显较高,甲状腺上皮细胞肥大增生,滤泡腔变小,腔内胶质减少或缺失;优甲乐组和理气消瘿片组的甲状腺滤泡恢复呈中等大小,滤泡腔变大,腔内胶体增多。

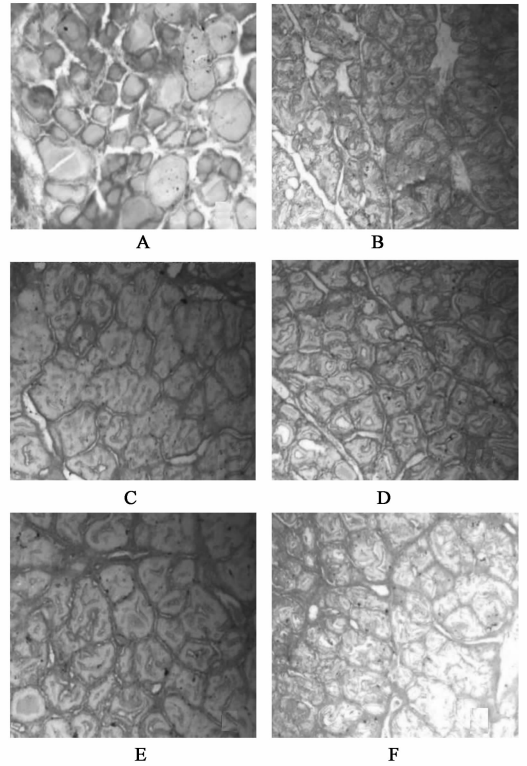


图1 理气消瘿片对大鼠甲状腺组织病变的影响(HE, ×400)
A. 正常组;B. 模型组;C. 理气消瘿片(2.4 g·kg⁻¹)组;D. 理气消瘿片(4.8 g·kg⁻¹)组;E. 理气消瘿片(9.6 g·kg⁻¹)组;F. 优甲乐(7.8 × 10⁻⁶ g·kg⁻¹)组(图2~4同)

3.4 对大鼠甲状腺组织 bFGF, TGF-β, Bcl-2 表达的影响 bFGF, TGF-β 和抗凋亡基因 Bcl-2 阳性表达见于细胞的胞浆或胞膜,在荧光显微镜下呈红色。与模型组比,理气消瘿片3个剂量组的 bFGF, Bcl-2 表达明显降低, TGF-β 表达明显升高,见表3,图2~4。

表3 理气消瘿片对大鼠甲状腺组织 bFGF, Bcl-2, TGF-β 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	Bcl-2	bFGF	TGF-β
正常	-	108 ± 33	0	6 941 ± 810
模型	-	59 796 ± 901 ¹⁾	1 457 ± 127 ¹⁾	269 ± 162 ¹⁾
理气消瘿片	2.4	1 579 ± 50 ^{1,2)}	201 ± 49 ^{1,2)}	2 101 ± 335 ^{1,2)}
	4.8	2 308 ± 266 ^{1,2)}	265 ± 32 ^{1,2)}	1 582 ± 195 ^{1,2)}
	9.6	2 150 ± 88 ^{1,2)}	246 ± 106 ^{1,2)}	1 881 ± 189 ^{1,2)}
优甲乐	7.8 × 10 ⁻⁶	1 783 ± 136 ^{1,2)}	240 ± 85 ^{1,2)}	2 093 ± 235 ^{1,2)}

注:与正常组比较¹⁾P < 0.01;与模型组比较²⁾P < 0.01。

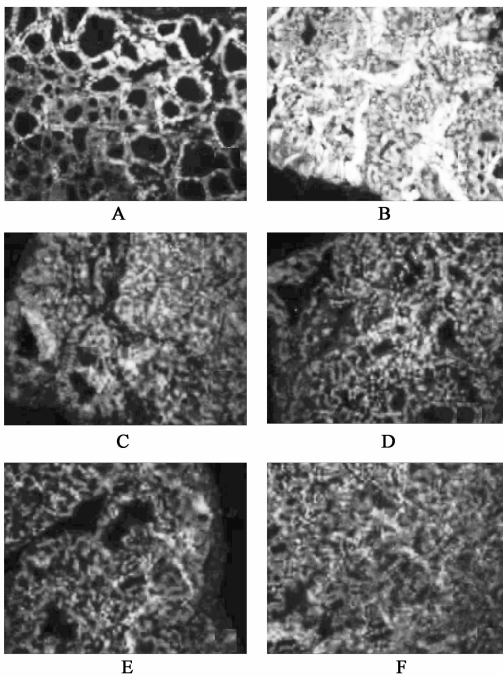


图 2 理气消瘿片对甲状腺组织 Bcl-2 表达的影响 (DAPI 染色, ×200)

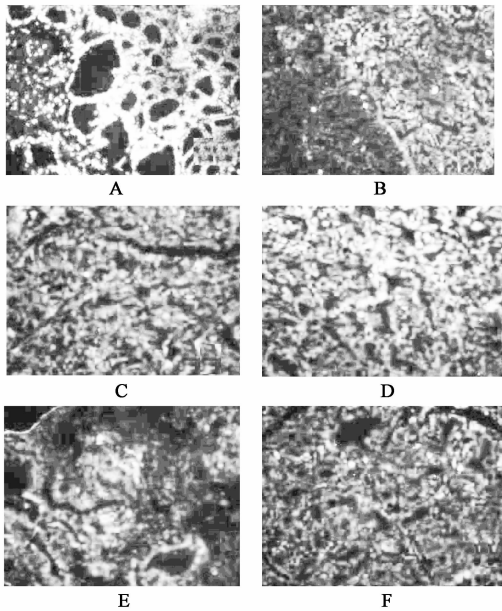


图 3 理气消瘿片对甲状腺组织 bFGF 表达的影响 (DAPI 染色, ×200)

4 讨论

理气消瘿片是湖北中医药大学陈如泉教授治疗瘿病的经验方,该方以青皮、柴胡为君药;郁金、橘叶为臣药,全方共奏疏肝理气、化痰消瘿之功效^[1]。实验结果显示,理气消瘿片能够显著降低模型大鼠的甲状腺指数,其具有一定的抗甲状腺肿作用。但其对甲状腺肿模型大鼠血清中 FT₃, FT₄, TSH 水平

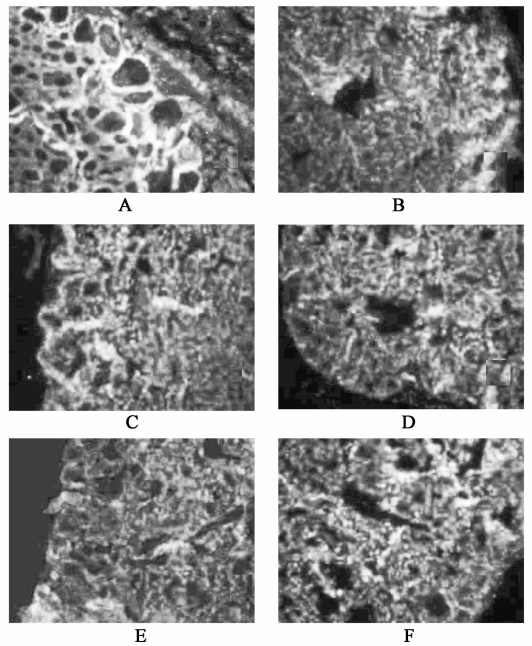


图 4 理气消瘿片对 TGF-β 表达的影响 (DAPI 染色, ×200)

影响不明显,与正常组比较虽然有所降低,却无显著性差异。提示理气消瘿片不是通过调节 FT₃, FT₄ 和 TSH 水平来减轻大鼠甲状腺肿大。

细胞凋亡是由基因调控的细胞自主有序的死亡,涉及了一系列基因的激活及表达和调控等作用^[6]。抗凋亡基因 Bcl-2 最初发现于滤泡型 B 细胞淋巴瘤,它可促进细胞存活而阻断细胞凋亡作用^[7],bFGF 是成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 家族成员之一,是一种重要的细胞有丝分裂促进因子,能促进细胞的分裂和增殖,有研究显示,bFGF 对甲状腺细胞功能和生长起重要的调节作用^[8]。Yoon 等研究表明 bFGF 可上调 Bcl-2 表达^[9]。TGF-β 属于多肽生长因子的超家族,有研究证实,TGF-β 可抑制碘化物俘获和甲状腺球蛋白的合成,在甲状腺细胞增殖中起负调节作用,并能够拮抗大鼠、猪和人类甲状腺细胞中生长因子的促有丝分裂作用,延缓 G₁ 阶段的进展^[10]。本研究结果表明理气消瘿片可降低大鼠甲状腺组织中 bFGF, Bcl-2 表达,增强 TGF-β 表达,这种改变可以抑制甲状腺细胞增生,促使甲状腺缩小,提示理气消瘿片抗甲状腺肿的作用机制可能与调节 bFGF, Bcl-2, TGF-β 蛋白表达有关,但是其具体的机制还有待进一步的研究。

[参考文献]

[1] 肖伊.理气消瘿片的制备工艺研究[D].武汉:湖北中医药大学,2011.

土茯苓对急性汞中毒大鼠的保护作用研究

郑捷, 郑宇翔, 肖凤霞*, 林励, 林靖然

(广州中医药大学中药学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**探讨土茯苓对急性汞中毒大鼠的保护作用。**方法:**将大鼠随机分为正常对照组、模型组、土茯苓高、中、低剂量组(5, 10, 20 g·kg⁻¹), 模型组及土茯苓高、中、低剂量组 sc 2.5 mg·kg⁻¹ HgCl₂ 溶液, 连续 2 d, 造成汞中毒, 正常对照组 sc 生理盐水; 土茯苓水煎液低、中、高剂量组末次染毒后开始 ig 给药, ig 体积 10 mL·kg⁻¹, 2 次/d, 早晚各 1 次, 持续 3 d, 观察土茯苓对染汞大鼠血清尿素氮(BUN)、汞、尿蛋白、尿乳酸脱氢酶(LDH)、尿碱性磷酸酶(ALP)活力、尿汞、肾汞、肝汞含量及肾脏病理组织学变化的影响。**结果:**与正常对照组比较, 模型组尿汞、血汞和肝汞、肾皮质汞含量, 尿 LDH 及 ALP 活力, 尿蛋白和血清 BUN 含量均显著提高($P < 0.01$), 肾脏损伤明显; 与模型组对比, 土茯苓水煎液高、中剂量组血清 BUN、尿蛋白, 尿 LDH 及 ALP 活力, 肾、肝及血汞含量显著降低, 尿汞含量显著增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 肾脏病理组织学观察结果显示, 高剂量组土茯苓对汞中毒大鼠肾损伤有较好的修复作用。**结论:**土茯苓具有能够改善汞中毒大鼠肝肾功能、去除体内汞蓄积的作用, 对汞中毒大鼠具有一定的防治作用。

[关键词] 土茯苓; 急性汞中毒; 保护作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0163-04

[doi] 10.11653/syjf2014040163

Role of *Smilax glabra* in Preventing Acute Mercury Toxicity in Rats

ZHENG Jie, ZHENG Yu-xiang, XIAO Feng-xia*, LIN Li, LIN Jing-ran

(School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of *Smilax glabra* in the protective effect of acute mercury

[收稿日期] 20130823(001)

[第一作者] 郑捷, 硕士研究生, 从事中药资源开发利用与新药研究, Tel: 18998412141, E-mail: 352163190@qq.com

[通讯作者] * 肖凤霞, 博士, 教授, 从事中药资源开发利用与新药研究, Tel: 020-39358250, E-mail: xfx92@163.com

[2] 冯其麟. 理气消瘿片的药学研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2008.

[3] 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 1512.

[4] 丁选胜, 阚毓铭, 李欧. 海藻甘草对甲状腺肿模型大鼠甲状腺激素及其抗体的影响[J]. 中草药, 2003, 34(1): 54.

[5] 马晓霞, 刘晓冬, 邵德荣. 右归丸加味联合优甲乐治疗亚临床甲状腺功能减退[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 240.

[6] 高天舒, 韩晓晴, 尹慧丝. 补中益气汤对甲状腺功能减退大鼠心肌细胞凋亡及 Fas, FasL 和 Caspase-3 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 236.

[7] Tsujimoto Y, Ikegaki N, Croce C M, et al.

Characterization of the protein product of Bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma [J]. Oncogene, 1987, 2(1): 3.

[8] Taylor A H, Millatt L J, Whitley G S, et al. The effect of basic fibroblast growth factor on the growth and function of human thyrocytes [J]. J Endocrinol, 1993, 136(2): 339.

[9] Yoon S N, Kim K S, Cho J H, et al. Phospholipase D1 mediates bFGF-induced Bcl-2 expression leading to neurite outgrowth in H19-7 cells [J]. Biochem J, 2012, 441(1): 407.

[10] D'Inzeo S, Nicolussi A, Nardi F, et al. Effects of the Smad4 C324Y mutation on thyroid cell proliferation [J]. Int J Oncol, 2013, 42(6): 1890.

[责任编辑] 聂淑琴