

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

高天舒¹, 韩晓晴^{2*}, 尹慧丝²

(1. 辽宁中医药大学附属医院内分泌科, 沈阳 110032; 2. 辽宁中医药大学, 沈阳 110032)

[摘要] 目的: 研究补中益气汤对甲状腺功能减退(甲减)大鼠心肌细胞凋亡及 Fas, FasL 和 Caspase-3 蛋白表达的影响。方法: 采用 Kolaja 法制备大鼠甲状腺功能减退模型。健康 Wistar 大鼠 120 只随机分成正常对照组、模型组、补中益气汤组(18.9 g·kg⁻¹)、左旋甲状腺素钠 L-T4 组(9.45 μg·kg⁻¹), 各组灌胃给药 56 d。光镜和电镜下观察心肌形态学和超微结构变化, TUNEL 法检测心肌凋亡细胞, 免疫组化检测凋亡相关基因蛋白 Fas, FasL, Caspase-3 的表达, ELISA 法测定血清促甲状腺激素(TSH), 放射免疫分析法测定血清总三碘甲状腺原氨酸(TT3)及总甲状腺素(TT4)。结果: 与正常组相比, 模型组心肌细胞凋亡指数及 Fas, FasL, Caspase-3 的表达均达高峰, 心肌细胞结构损伤严重, 经治疗后补中益气汤组(12.10 ± 0.73)和 L-T4 组(29.26 ± 2.10)的心肌细胞凋亡指数降低, Fas, FasL 及 Caspase-3 的阳性表达均下降, 且补中益气汤组的疗效优于 L-T4 组(P < 0.05)。结论: 甲减引起心肌细胞凋亡增多, Fas, FasL, Caspase-3 表达升高, 而补中益气汤可明显降低心肌细胞凋亡指数, 下调 Fas, FasL 及 Caspase-3 的表达, 说明补中益气汤对甲减的心肌损害有干预保护作用。

[关键词] 补中益气汤; 甲状腺功能减退; 细胞凋亡; Fas; FasL; Caspase-3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0236-05

Influence of Buzhong Yiqi Tang on Myocardial Apoptosis and Expression of Proteins Fas, FasL and Caspase-3 in Rats of Hypothyroidism

GAO Tian-shu¹, HAN Xiao-qing^{2*}, YIN Hui-si²

(1. Endocrinology Department of Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China; 2. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Buzhong Yiqi Tang (tonifying middle-Jiao and Qi treatment) on myocardial apoptosis and expression of proteins Fas, FasL and Caspase-3 in hypothyroid rats. **Method:** The rat of hypothyroidism models were prepared by Kolaja method. Healthy wistar rats were randomly divided into normal control group, model group, Buzhong Yiqi Tang group, Letrox (L-T4) group. The morphological and ultrastructural changes were observed under optical microscope and electronic microscope respectively. Apoptotic cells were measured by TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method. The expression of apoptosis-related proteins Fas, FasL and Caspase-3 were detected with immunohistochemical methods. TSH was measured by ELISA, Total 3 Triiodothyronine (TT3) and Total 4 Triiodothyronine (TT4) were measured by RIA; detect the iodine in urine. **Result:** Compared with control group, the apoptosis index and the expression of Fas, FasL and Caspase-3 reached the highest level in the model group, myocardial cell injured severely. After treatment the apoptosis index of Buzhong Yiqi Tang group (12.10 ± 0.73) and L-T4 group (29.26 ± 2.10) decreased, the expression of Fas, FasL and Caspase-3 also reduced, and the effectiveness of Buzhong Yiqi Tang

[收稿日期] 20111226(002)

[基金项目] 辽宁省教育厅项目(2009A492); 辽宁省教育部博士点基金项目(20092133110004); 辽宁省教育厅优秀人才计划项目(LR201026)

[第一作者] 高天舒, 博士, 教授, 从事临床科研工作, Tel: 18602470827, E-mail: gaotianshu67@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 韩晓晴, 硕士, 医师, 从事临床科研工作, Tel: 13644904516, E-mail: 249268519@qq.com

group was better ($P < 0.05$). **Conclusion:** Hypothyroidism causes increase of myocardial cell apoptosis, heightened expression of Fas, FasL and Caspase-3, while Buzhong Yiqi Tang might decrease the myocardial apoptosis and lower the expression of protein Fas, FasL and Caspase-3 significantly, it indicated that Buzhong Yiqi Tang has protective action on myocardial injury of hypothyroidism.

[**Key words**] Buzhong Yiqi Tang; hypothyroidism; cell apoptosis

甲状腺功能减退(简称甲减)是临床常见的内分泌疾病,与心肌的损伤密切相关。与甲状腺功能正常相比,甲减病人的外周血管阻力,心率,射血分数及心脏每搏输出量均明显降低。心血管健康研究发现血清促甲状腺素(TSH) $\geq 10 \text{ mU} \cdot \text{L}^{-1}$ 的成人发生心衰的风险较甲状腺功能正常的成人明显增加^[1]。作者在实验性甲减大鼠模型中已经检测到心肌细胞凋亡,其凋亡程度与血清 T3 和 T4 呈负相关,与 TSH 呈正相关^[2]。在针对甲减心肌损伤的治疗上,现代研究结果提示:甲减患者用标准化甲状腺激素替代治疗并没有达到健康的状态^[3],替代治疗并不能修复甲减导致的心肌、肾脏、大脑等重要脏器的损伤。近年来有关甲减对心肌损伤的研究报告在不断增加,中医对甲减的治疗和研究已经积累了丰富的资料,以往研究表明补中益气汤可以明显降低甲减大鼠血清 CK,CK-MB 水平,提高血清 T3 水平,但作用机制不清楚。故在此基础上,本实验拟从心肌细胞凋亡方面探讨补中益气汤对实验性甲减大鼠的治疗效果及其作用机制。

1 材料

1.1 动物 4 周龄清洁级健康 Wistar 大鼠 120 只,体重 90 ~ 120 g,雌雄各半,由中国医科大学实验中心提供,动物许可证号 SCXK(京)2009-0004。

1.2 动物饲料 普通饲料:由辽宁中医药大学实验动物中心提供。低碘饲料:根据卫生部地方病调查以及中国医科大学流行病学结果和承德市地方病研究所提供的资料,采用全国重度缺碘地区河北省承德市隆化县大两间房村的玉米、谷子和黄豆,按照 73:20:7 的比例,加入适量的添加剂(每 100 g 饲料添加 CaCO_3 0.5 g, Na_2HPO_4 0.15 g, MnSO_4 50 mg, 维生素 B6 6 mg, 维生素 B₁₂ 0.05 mg, 泛酸钙 5.5 mg, 叶酸 0.1 mg, CoCl_2 4.95 μg , 宝力维他 20 mg, 酵母粉 1 g),由沈阳市于洪区前民实验动物饲料加工厂压制成低碘饲料,饲料碘含量为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。双蒸馏水,由辽宁中医药大学附属医院临床药品基地提供。

1.3 药品与试剂 补中益气汤组成:黄芪 40 g,甘草 10 g,人参 20 g,升麻 6 g,柴胡 6 g,橘皮 12 g,当

归 20 g,白术 20 g。均由辽宁中医药大学附属医院中药局提供,水煎液均置于 4 °C 下备用。左旋甲状腺素钠片(L-T4),德国默克,批号 51270013。血清 TT3,TT4 试剂盒由北京赛博润科技发展有限公司提供;血清 TSH 试剂盒购自 Rapid Bio 公司;Fas,FasL 及 Caspase-3 多克隆抗体,免疫组化 SP 试剂盒,DAB 显色剂均由北京中杉公司提供。TUNNEL 试剂盒购自武汉博士德生物技术公司。乌拉坦(分析纯)购自沈阳市试剂二厂。低碘饲料中添加剂(高氯酸钠, CaCO_3 , Na_2HPO_4 , MnSO_4 等)均购自国药集团。

1.4 仪器 DS-671 型电子秤(上海寺冈电子有限公司),1-13 小型台式离心机(美国 Sigma),Biometra PCR 扩增仪(德国);UV300 紫外分光光度计(英国 UV-visible Spectrometer),DK-8B 型电热恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司),BIO-DAD 680 酶标仪,FJ-2008 PS γ 记数仪、切片机(均为德国 Leica 公司),VXE380 超低温冰箱(法国,Jouan),日立 7600 全自动生化分析仪(美国贝克曼公司),65II 型心电图机(日本光电),Olympus 生物显微镜(Japan)。JEM-1200EX 透射电子显微镜(日立)。

2 方法

2.1 动物造模与分组 将 120 只大鼠随机分为:正常对照组、模型组、补中益气汤组、L-T4 组,每组 30 只。正常组饲以普通饲料及双蒸馏水,实验组造模参照 Kolaja 法,饲以实验专用的低碘饲料,喂 1% 高氯酸钠 19 d 后停用,续喂双蒸馏水 2 d(共计 21 d),给处理因素后仍饲以低碘饲料及双蒸馏水,直至实验结束。

2.2 给药 正常组饲以普通饲料,每日 4 mL 双蒸水分两次等量灌服。模型组饲低碘饲料,每日 4 mL 双蒸水分两次等量灌服。补中益气汤组饲低碘饲料,灌服含生药量为 $18.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的补中益气汤煎剂,并灌服 2 mL 双蒸水。L-T4 组饲低碘饲料,灌服 L-T4 含量为 $9.45 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的混悬液,并灌服 2 mL 的双蒸水。给处理因素 56 d 后处死动物。

2.3 标本采集与保存 ①收集血清:处死动物前,称体重,腹腔注射 20% 乌拉坦麻醉,腹主动脉采血 5 mL,以 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 分离 10 min,血清存 1.5 mL

ependorf 管中, -20 ℃冰柜中保存。②快速取材:腹主动脉采血后,准确迅速取出心脏,以冷盐水充分灌洗,滤纸拭干并迅速称湿重,后取左室壁中部横断面心肌组织于固定液中固定,用于标本的制作。

2.4 观察指标

2.4.1 检测甲状腺激素及 TSH 水平 放射免疫分析法测定血清 TT4, TT3; 血清促甲状腺激素(TSH)测定采用 ELISA 法, Rapid Bio 试剂盒。

2.4.2 心肌形态学光镜观察 迅速准确取出心脏, 从大鼠左室心尖部切取 1 mm × 1 mm × 1 mm 心肌组织, 4% 多聚甲醛磷酸缓冲溶液中固定 24 ~ 48 h, 常规脱水、浸蜡、包埋、染色、透明和封片, 制成 5 mm 厚 HE 切片, 进行光镜观察。

2.4.3 心肌超微结构的电镜观察 每组均取心尖区心肌, 切取约 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小的组织块, 2.5% 戊二醛固定, 1% 锇酸再固定, 清洗、脱水、浸透、包埋, 50 nm 超薄切片, 醋酸铀 15 min 和枸橼酸铅 30 min 双重电子染色, 透射电子显微镜观察、照相。

2.4.4 原位末端标记法(TUNEL 法)检测心肌细胞凋亡 常规方法做心肌 HE 染色, 光镜下观察心肌细胞形态。将蜡块做 5 um 厚连续切片。按 Boster 公司原位细胞凋亡 POD 试剂盒的步骤操作检测心肌细胞凋亡。阴性对照不加 TUNEL 反应物 TdT。

DAB 显色。阳性细胞判定和计数: 凋亡细胞细胞核呈棕褐色。每张切片高倍镜下随机选 5 个视野, 由一名专业人员双盲法数 1 000 个滤泡上皮细胞, 计数阳性细胞数。

2.4.5 Fas, FasL 和 Caspase-3 蛋白表达的检测 采用 SABC 免疫组织化学法检测 Fas, FasL 和 Caspase-3 的蛋白表达情况, 按照试剂盒说明书操作, 制成的中性树胶封片在光镜下阅片并摄像。

2.4.6 计算机图像分析 每张切片都在高倍镜(10 × 40)下观察, 随机采集 5 个不重复视野, 录入计算机图像采集与分析系统, 由 PC 机进行图像分析处理, 检测 Fas, FasL 和 Caspase-3 蛋白阳性细胞数目和平均灰度值。阳性蛋白数目增多时, 平均灰度值降低即表达增强。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两个样本均数比较采用 *t* 检验, 两个以上样本均数比较采用方差分析, *P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 血清 TT3, TT4 及 TSH 水平 与正常组相比, 模型组血清 TT3, TT4 降低, TSH 升高(*P* < 0.05); 经治疗后, 补中益气汤组与 L-T4 组血清 TT3, TT4 上升, TSH 下降, 两组之间差异有统计学意义(*P* < 0.05), 见表 1。

表 1 补中益气汤对模型大鼠 TT3, TT4, TSH 及心肌细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	TT3/nmol · L ⁻¹	TT4/nmol · L ⁻¹	TSH/mU · L ⁻¹	凋亡率/%
正常	-	1.66 ± 0.26	72.64 ± 23.98	0.88 ± 0.20	4.52 ± 0.26
模型	-	0.92 ± 0.29 ¹⁾	28.30 ± 17.73 ¹⁾	4.51 ± 1.01 ¹⁾	45.64 ± 2.32 ¹⁾
L-T4	9.45 × 10 ⁻⁶	2.16 ± 0.26 ²⁾	87.32 ± 6.55 ²⁾	1.56 ± 0.08 ²⁾	29.26 ± 2.10 ^{1,2)}
补中益气	18.9	1.72 ± 0.45 ²⁾	72.97 ± 25.75 ³⁾	0.93 ± 0.03 ²⁾	12.10 ± 0.73 ^{1,2,3)}

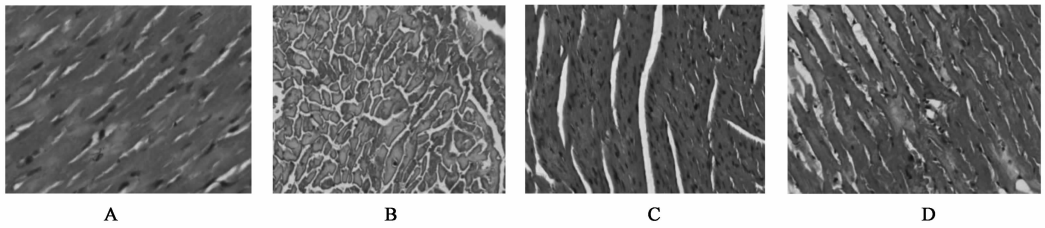
注: 与正常组比较¹⁾ *P* < 0.05; 与模型组比较²⁾ *P* < 0.05; 与 L-T4 组比较³⁾ *P* < 0.01。

3.2 大鼠心肌形态学变化 光镜下观察可见: 正常组心肌纤维排列整齐, 横纹清晰, 胞核明显。模型组心肌细胞横纹结构不清, 肌纤维肿胀断裂, 部分胞浆溶解消失, 有多处液化性坏死。补中益气汤组心肌细胞排列较整齐, 胞核清晰, 肿胀明显减轻。L-T4 组肌纤维肿胀减轻, 液化坏死较模型组有减少, 见图 1。

3.3 大鼠心肌细胞凋亡变化 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡, 棕褐色或棕黄色细胞核为凋亡细胞, 细胞核蓝染为非凋亡细胞, 阴性对照无棕色着色。与正

常组比较, 模型组与治疗各组均出现大量凋亡细胞(*P* < 0.05); 经各自治疗后, 补中益气组较模型组与 L-T4 组心肌细胞凋亡指数明显减少, 差异有统计学意义(*P* < 0.05), 见图 2, 表 1。

3.4 大鼠心肌组织 Fas, FasL 和 Caspase-3 的蛋白表达情况 光镜下, Fas, FasL 及 Caspase-3 的蛋白免疫阳性细胞胞浆呈棕黄色, 散在分布。与正常组比较各组的阳性细胞表达明显增多(*P* < 0.05), 其中模型组阳性表达最高; 两个治疗组均能减少阳性细胞表达, 以补中益气组减少幅度最大(*P* < 0.05), 见表 2。



A. 正常组; B. 模型组; C. 补中益气汤 18.9 g·kg⁻¹组; D. L-T4 9.45 μg·kg⁻¹组(图 2~3 同)

图 1 光镜下不同处理因素对心肌形态学的影响(HE 染色, ×400)

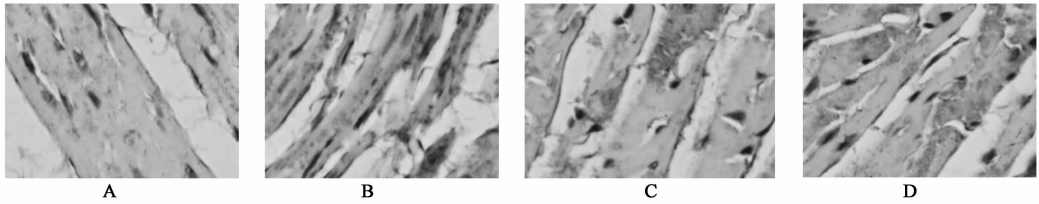


图 2 不同处理因素对大鼠心肌细胞凋亡的影响(TUNEL 染色, ×400)

表 2 补中益气汤对模型大鼠心肌 Fas, FasL 和 Caspase-3 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	Fas		FasL		Caspase-3	
	细胞数/个	灰度	细胞数/个	灰度	细胞数/个	灰度
正常	5.43 ± 0.45	32.29 ± 5.47	2.64 ± 0.21	30.18 ± 5.28	2.14 ± 0.23	61.32 ± 5.14
模型	11.36 ± 0.93 ¹⁾	137.33 ± 20.16 ¹⁾	10.36 ± 0.86 ¹⁾	101.82 ± 14.69 ¹⁾	9.74 ± 0.83 ¹⁾	160.06 ± 28.26 ¹⁾
L-T4	10.92 ± 0.88 ¹⁾	81.31 ± 18.36 ^{1,2)}	8.42 ± 0.69 ^{1,2)}	88.04 ± 12.34 ^{1,2)}	8.69 ± 0.62 ^{1,2)}	115.61 ± 16.62 ^{1,2)}
补中益气	7.36 ± 0.74 ^{1,2,3)}	40.75 ± 8.46 ^{1,2,3)}	5.87 ± 0.49 ^{1,2,3)}	60.15 ± 9.97 ^{1,2,3)}	6.74 ± 0.57 ^{1,2,3)}	89.49 ± 15.32 ^{1,2,3)}

注:与正常组相比¹⁾ $P < 0.05$;与模型组相比;²⁾ $P < 0.05$,与 L-T4 组相比³⁾ $P < 0.05$ 。

3.5 大鼠心肌超微结构变化 透射电镜下可见:正常组肌纤维排列整齐,Z 线、M 线清楚,相邻肌纤维间有大量线粒体,椭圆形,膜完整,嵴清晰。模型组整个细胞水肿严重,线粒体部分或大部嵴与膜融合

或消失,肌节排列紊乱,肌纤维消失。补中益气组肌节排列较规整,Z 线、M 线清楚,少量线粒体嵴与膜融合破损。L-T4 组肌节排列不整齐,心肌细胞水肿,线粒体多嵴减少,外膜破损并膨出,见图 3。

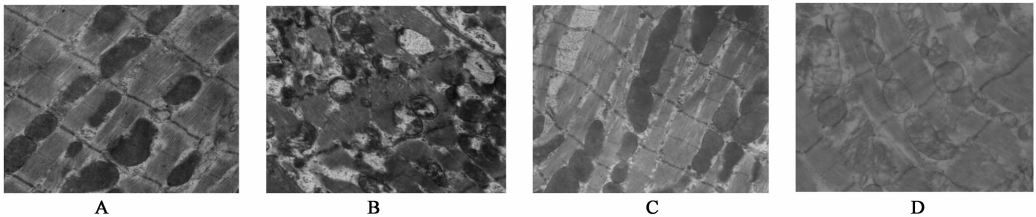


图 3 补中益气汤对心肌超微结构的影响(电镜, ×5000)

4 讨论

甲减属祖国医学“虚劳”的范畴。近几年中医对本病的研究报告在不断增加,著名医家祝湛予善用补中益气汤配五苓散治疗甲减;还有医家用甘草人参汤或二草人参汤治疗甲减均取得很好的疗效^[4],以参芪为代表的健脾益气药被广泛地应用于甲减治疗中,我们以补中益气汤为主治疗甲减取得很好的疗效,说明脾气虚弱是甲减的重要病机,健脾益气,补中益气应是甲减的重要治法^[5]。补中益气

汤由黄芪、人参、升麻、柴胡、当归、白术等药物组成,诸药合用,共奏益气健脾之功。

细胞凋亡是由基因调控的细胞自主有序的死亡,它涉及一系列基因的激活、表达及调控等作用^[6]。Fas 蛋白是目前发现的最重要的促凋亡基因之一,Fas 蛋白与配体 FasL 结合后可诱导 Fas 细胞的凋亡,向细胞内传送死亡信号,故称 Fas 为死亡分子;Caspase-3 是细胞凋亡过程中的效应分子,不同的蛋白酶切割 Caspase-3 使其活化,活化后的

细柱五加果实提取物对免疫抑制小鼠的免疫调节作用

张正光^{1,2}, 黄厚才², 钱士辉^{1,2*}

(1. 南京中医药大学, 南京 210046; 2. 江苏省中医药研究院, 南京 210028)

[摘要] 目的: 研究细柱五加果实乙醇提取物对免疫抑制小鼠的免疫调节作用。方法: 将小鼠随机平均分为细柱五加果实的高、中、低3个剂量组(2.8, 1.4, 0.7 g·kg⁻¹)、阳性对照组(20 mg·kg⁻¹左旋咪唑)、空白对照组和模型对照组(各组 n = 10)。各组小鼠均 ig 给药(20 mL·kg⁻¹)。连续 10 d。空白对照组和模型对照组均 ig 同等剂量的蒸馏水。从第 7 天开始, 除空白对照组外, 其余各组小鼠均 ip 环磷酰胺(80 mg·kg⁻¹)以制作免疫抑制小鼠模型。连续 4 d。采用免疫器官质量法和碳粒廓清法, 以脾脏指数、胸腺指数、碳粒廓清指数及校正吞噬指数为指标来评价细柱五加果实乙醇提取物对免疫抑制小鼠非特异性免疫功能的影响; 采用血清溶血素测定法, 以血清溶血素含量为指标来评价细柱五加果实乙醇提取物对免疫抑制小鼠特异性免疫功能的影响。结果: 细柱五加果实乙醇提取物对免疫抑制小鼠的脾脏指数和胸腺指数无显著性影响, 但可以提高其碳粒廓清指数、校正吞噬指数和血清溶血素含量(P < 0.05 或 P < 0.01)。结论: 细柱五加果实乙醇提取物对免疫抑制小鼠的非特异性免疫功能和特异性体液免疫功能均有提高作用。

[关键词] 细柱五加; 果实; 乙醇提取物; 环磷酰胺; 免疫功能

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0240-04

[收稿日期] 20111114(006)

[基金项目] 江苏省公益研究项目(BM2010610)

[第一作者] 张正光, 在读硕士研究生, 从事中药资源开发研究, Tel: 13815878627, E-mail: zzwang1221@sina.com

[通讯作者] * 钱士辉, Tel: 025-85639644, E-mail: njqsh2005@126.com

Caspase-3 进一步切割不同底物, 使蛋白酶的效应级联放大, 最后导致细胞死亡。故 Caspase-3 是 Fas/FasL 介导的凋亡信号途径下游的关键性效应蛋白, 细胞是否发生凋亡关键在于细胞质中活化的 Caspase-3 表达量^[7]。本实验光镜和电镜下观察可见模型组大鼠的心肌纤维明显的损伤坏死, 模型组大鼠不仅心肌细胞凋亡率升高, Fas, FasL 和 Caspase-3 的阳性表达也明显上调。而研究结果显示: 补中益气汤组较模型组及 L-T4 组的心肌凋亡率明显减少, Fas, FasL 和 Caspase-3 的阳性表达下降。这进一步表明补中益气汤对甲减心肌凋亡相关基因的蛋白表达有明显的调节作用, 即显著降低促凋亡基因 Fas, FasL 和 Caspase-3 的蛋白表达, 降低心肌细胞凋亡率, 从而抑制和阻断细胞凋亡的发生, 这可能是补中益气汤保护甲减心肌损害的机制之一。

[参考文献]

[1] Rodondi N, Bauer D C, Cappola A R, et al. Subclinical

thyroid dysfunction, cardiac function, and the risk of heart failure [J]. The Cardiovascular Health study Jam Coll Cardiol, 2008, 52(14): 1152.

[2] 周泉, 李志梁, 王素华, 等. 大鼠甲状腺功能状态对心肌细胞凋亡的影响[J]. 第四军医大学学报, 2007, 7(6): 639.

[3] Shah A N, Dubrey S W, Thomas D. Hypothyroid cardiomyopathy due to hypopituitarism [J]. Diagnostic dilemma Clin Med. 2007, 7(6): 639.

[4] 李文静, 陈如泉. 甲状腺机能减退症的中医临床及实验研究综述[J]. 国医论坛, 1998, 13(6): 39.

[5] 王英娜, 高天舒. 从脾虚痰瘀论治桥本甲状腺炎 30 例疗效观察[J]. 新中医, 2008, 20(12): 52.

[6] 蒋立峰, 桑峰, 蒋士卿, 等. 精元康胶囊对骨髓抑制小鼠骨髓细胞凋亡相关基因表达水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 121.

[7] 陈月桥, 王丽, 武建华. 细胞凋亡信号传导途径研究进展[J]. 中国实用医药, 2007, 33(2): 186.

[责任编辑 古云侠]