

右归丸对实验性甲状腺功能减退大鼠骨骼肌 GluT 4 mRNA 表达水平的影响

贾锡莲¹ 徐灿坤² 周 阳³ 曲竹秋¹

摘要 目的:研究温阳补肾中药右归丸对实验性甲状腺功能减退症大鼠的治疗作用及对骨骼肌葡萄糖转运蛋白 4(GluT 4) mRNA 表达的影响。方法:采用丙基硫氧嘧啶灌胃给药造成实验性甲减大鼠模型,然后给予不同的治疗方案,治疗 8 周后处死大鼠,取血检测甲状腺功能,取肌肉组织检测 GluT 4 mRNA 表达量。结果:模型组大鼠骨骼肌 GluT 4 mRNA 表达显著降低,约相当于正常表达水平的 14.37%。治疗后右归丸中剂量组、右归丸高剂量组、中西药合用组 GluT 4 mRNA 表达明显提高,大致恢复正常范围;而西药组、右归丸低剂量组、自拟方组与模型组相比无明显变化。结论:右归丸能上调甲减大鼠骨骼肌 GluT 4 mRNA 表达水平,促进骨骼肌对葡萄糖的转运,从而改善骨骼肌细胞的能量代谢,这可能是中药能有效治疗甲状腺功能减退症的作用机理之一。

主题词 甲状腺功能减退症/中医药疗法 肌,骨骼/药物作用 右归丸/治疗应用

Effect of Yougui Wan on GluT⁴ mRNA Expression in the Skeletal Muscle of Experimental Hypothyroidism Rats

Jia Xilian¹, Xu Cankun², Zhou Yang³, et al.

(1. General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300070; 2. Doctor' Degree Student of Class 2003, Tianjin Medical University; 3. Master's Degree Student of Class 2003, Tianjin Medical University)

Objective: To study the effect of Yougui Wan on experimental hypothyroidism and GluT⁴ mRNA expression in the skeletal muscle of experimental hypothyroidism rats. **Methods:** Experimental hypothyroidism rat model was made with intragastrical perfusion of propylthiouracil (PUT) and was treated with different treatment programs. After treatment for 8 weeks, the rats were killed and the blood sample was taken for examination of thyroid hormones, and the muscular tissue was taken to detect GluT⁴ mRNA expression. **Results:** GluT⁴ mRNA expression in the skeletal muscle significantly decreased in the model group, corresponding to 14.37% of the normal expression; After treatment, the GluT⁴ mRNA expression significantly increased to about the normal range in the Yougui Wan mid dose group, Yougui Wan high dose group, and the integrated Chinese and western medicine group. There was no significant changes as the western medicine group, Yougui Wan low dose group, self-stipulated recipe group compared with the model group. **Conclusion:** Yougui Wan can up-regulate GluT⁴ mRNA expression in the skeletal muscle of hypothyroidism rats, promoting transport of glucose in the skeletal muscle, so as to improve energy metabolism of the skeletal muscular cells, which is possibly one of the mechanisms of the Chinese medicine effectively treating hypothyroidism.

Key Words Hypothyroidism/TCM therapy; Muscle, skeletal /drug effect; Yougui Wan/therapeutic use

甲状腺功能减退症(简称甲减)的病因和病机尚未完全清楚,但基本认为是器官特异的自身免疫性疾病。甲减临床特征为代谢减慢和脏器功能低下,代谢减慢体现在糖代谢上即为脏器组织对葡萄糖的利用降低,临床表现为怕冷、少汗、少言懒动、动作缓慢、体温偏低、肌肉软弱无力等。葡萄糖转运蛋白 4(GluT 4)是胰岛素反应性转运体,介导细胞外葡萄糖进入细胞内,促进葡萄糖的摄取与利用^[1]。本研究拟从骨骼肌糖代谢方面探讨中药右归丸对实验性甲减大鼠的治疗效果及其作用机理,现报告如下。

1 材料

1.1 动物:雌性 SD 大鼠 80 只,清洁级,体重 180~220g,购自军事医学科学院实验动物中心,饲养于天津医科大学卫生学院实验动物中心,饲养环境符合医学实验动物环境设施要求。

1.2 药物:右归丸购自北京同仁堂股份有限公司,规格:9g×10 丸/盒。组成:熟地黄、炮附子、肉桂、山药、山茱萸、菟丝子、鹿角胶、枸杞子、当归、杜仲。批准文号:Z11021040。用开水将药丸融化,然后加生理盐水调至低、中、高 3 个浓度,分别为 0.140g/ml、0.275g/ml、0.550g/ml。丙基硫氧嘧啶(PTU)购自深圳市中联制药有限公司,规格:50μg×100 片/盒,批准文号:H20013255。用研钵把药品研碎,与生理盐水配成 0.1%的溶液。甲状腺片购自上海实业联合集团长城药业有限公司,规格:40mg×100 片/盒,批准文号:

基金项目:天津市卫生局中西医结合科研基金课题(2032)

1 天津医科大学总医院中医科,天津市和平区鞍山道 154 号(300070)

2 天津医科大学 2003 级博士研究生

3 天津医科大学 2003 级硕士研究生

收稿日期:2005-10-27;修回日期:2005-12-21

H31022151。用研钵把药品研碎,与生理盐水配成 0.08% 甲状腺片混悬液。中药自拟方(曲竹秋教授经验方)组成:黄芪 15g,茯苓 15g,白术 10g,白芍 15g,附子 10g,生姜 15g,购自天津医科大学总医院中药房。取处方药材常规煎煮两次后,将两煎药液混合,约 300ml,再浓缩至 100ml,每毫升药液约含生药 0.8g。

1.3 试剂:TriReagent、RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit、Taq DNA Polymerase、10mM dNTP、GeneRuler 100bpDNA Ladder 均系 Fermentas 产品,购自晶美生物工程有限公司。DEPC(焦碳酸二乙酯)购自中国联星实业有限公司。FT4、FT3、T3、T4、sTSH 检测试剂盒购自美国 Bayer Health Care 公司。

1.4 主要仪器:5415R 低温高速离心机, Authorized Thermal Cycler PCR 扩增仪, Biophotometer 紫外分光光度计均系德国 Eppendorf 公司产品。Gel 凝胶图像分析系统为意大利 Bio-RAD Laboratories 公司产品。

2 方法

2.1 动物分组与造模^[2~4]:80 只大鼠按随机区组设计分为 8 组,每组 10 只。即模型组,右归丸低、中、高剂量组,西药组,中西药合用组,自拟方组,正常对照组。除正常对照组外,其余各组给予 0.1% 的 PTU 溶液灌胃,给药剂量为 1mg/100g(1ml/100g)。正常对照组给予等量的自来水。15 天后检测甲状腺功能,sTSH>10μU/ml 为造模成功(结合文献和预实验结果)。参照预实验结果(我们在预实验中发现,造模药灌胃 15 天后即可出现甲状腺功能减退,但停用 7 天后其甲状腺功能即可基本恢复正常,所以应持续给予造模药),治疗期间继续给予造模药,剂量同上,但改为隔日 1 次。

2.2 治疗方法:造模成功后开始治疗,连续给药 8 周,每周称体重 1 次以调整给药剂量,剂量换算方法参照贺石林主编的《中医科研设计与统计方法》^[5]制订。模型组继续给予 PTU 至实验结束,剂量为 1mg/100g,隔日 1 次。西药组给予 0.08% 甲状腺片混悬液 1ml/100g,造模药同模型组。右归丸低剂量组给予右归丸液 0.140g/100g,造模药同上。右归丸中剂量组给予右归丸液 0.275g/100g,造模药同上。右归丸高剂量组给予右归丸液 0.550g/100g,造模药同上。中西药合用组给予右归丸液 0.275g/100g,0.08% 甲状腺片混悬液,1ml/100g,造模药同上。自拟方组根据曲竹秋教授经验方煎制汤剂,0.9ml/100g(约相当于生药 0.72g/100g),造模药同上。正常对照组给予自来水灌胃,剂量为 1ml/100g。

2.3 取血与取材:造模 15 天后,从目内眦取血 2~3ml 检测甲状腺功能,观察是否造模成功,造模成功后

开始治疗;治疗 8 周后,股动脉放血处死大鼠,并取血检测甲状腺功能。解剖大鼠,取大鼠的骨骼肌(腓肠肌),液氮速冻,置-70℃冰箱保存待测。

2.4 甲状腺功能五项检测:采用化学发光法,由天津医科大学总医院特检中心负责完成。

2.5 GluT4 mRNA 检测:在天津医科大学免疫学教研室完成。

2.5.1 引物设计:(1) GluT4 cDNA 引物:从 PubMed 的 Gene Bank 检索 GluT4 mRNA 序列,基因编号 M25482,根据软件 Primer Premier 5.0 设计引物。正义引物:5'-GCCAGCCTACGCCACCATA-3';反义引物:5'-ACCCATAGCATCCGCAAC-3';扩增片段为 1068~1443bp,共 376bp。(2) βactin cDNA 引物:设计方法同上。正义引物:5'-CAGCATG-GAGGGGCCGACTCATC-3';反义引物:5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3';扩增片段为 157~397bp,共 241bp。引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

2.5.2 总 RNA 提取:取-70℃冻存腓肠肌,称取 100mg 剪碎后放入匀浆管,加入 1ml Trizol 核酸提取液制成匀浆液,按操作说明提取总 RNA,测定其纯度及含量,提取的总 RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.7~2.0,纯度>90%。

2.5.3 逆转录反应(RT):于 40μl 反应体系中,取 2μg 总 RNA,依次加入 0.5μg/μl 的 Oliogo(dT) 2μl、5×M-MLV Buffer 8μl、10mM dNTP 4μl、RNasin 2μl、M-MLV 2μl,DEPC 水补至总体积为 40μl。逆转录条件为 70℃ 5 分钟,42℃ 60 分钟,70℃ 5 分钟。RT 产物-20℃保存。

2.5.4 聚合酶链式反应(PCR):取 RT 产物 2μl,依次加入 10×Taq 缓冲液 5μl、10mM dNTP 1μl、10pmol/L 的上下游引物各 2.5μl、25mM 的 MgCl₂ 3μl、1U/μl Taq 酶 1.25μl,加灭菌纯水至 50μl,混匀。反应参数为 95℃ 预变性 5 分钟,94℃ 变性 1 分钟,57℃ 退火 1 分钟,72℃ 延伸 1 分钟,30 个循环,结束前 72℃ 终末延伸 10 分钟。PCR 产物 4℃ 保存待电泳。

2.5.5 电泳及分析:PCR 反应结束后,分别取 PCR 产物 5μl,6×loading 上样缓冲液 1μl,混匀后上样于 1.0% 琼脂糖凝胶(含 10mg/ml 的溴化乙锭 2μl)、1×TBE 电泳缓冲液中,80V 电压,电泳 50 分钟。电泳结束后紫外灯下初步观察,结果满意时以凝胶成像分析系统拍照,用凝胶成像分析软件测定其相对光密度,计算 GluT4、βactin 的光密度比值作为半定量指标。

2.6 统计学方法:多组比较采用单因素方差分析,组

间两两比较用 q 检验。采用 SPSS 10.0 统计软件。

3 结果

3.1 对骨骼肌 GluT 4 mRNA 表达的影响:根据电泳图灰度值,计算出各组大鼠骨骼肌 GluT 4 mRNA 的表达量,结果见表 1。与正常对照组比较,模型组骨骼肌 GluT 4 mRNA 表达显著降低($P<0.01$),约相当于正常表达水平的 14.37%。治疗后右归丸中剂量组、右归丸高剂量组、中西药合用组皆大致恢复至正常范围,与正常对照组差异无显著性($P>0.05$);而西药组、右归丸低剂量组、自拟方组与模型组比较差异无显著性($P>0.05$),与正常对照组比较差异有显著性($P<0.01$),说明这 3 组骨骼肌 GluT 4 mRNA 表达水平治疗后无明显改善。

3.2 造模成功后各组甲状腺功能比较:给予造模药 15 天后,取血检测甲状腺功能。表 2 示,与正常对照组比较,模型组及各治疗组 FT₄、FT₃ 数值均明显下降($P<0.01$),低于正常值,sTSH 均 >10 mIU/ml,提示造模成功。

3.3 治疗 8 周后各组甲状腺功能比较:治疗 8 周后,再次取血检测甲状腺功能。表 3 示,各治疗组 FT₄ 与模型组比较差异无显著性($P>0.05$),与正常对照组比较差异有显著性($P<0.01$),均未恢复正常;右归丸低剂量组、右归丸中剂量组、中西药合用组、自拟方组 FT₃ 与模型组比较差异有显著性($P<0.05$),与正常对照组比较差异无显著性($P>0.05$),说明治疗后这几组的 FT₃ 恢复正常,西药组、右归丸高剂量组 FT₃ 与正常对照组比较差异有显著性($P<0.05$),与模型组比较差异无显著性($P>0.05$),提示这两组的 FT₃ 未恢复正常;右归丸低剂量组、右归丸中剂量组、中西药合用组、自拟方组 T₃ 与模型组比较差异均有显著性($P<0.05$),基本恢复正常,与正常对照组比较差异无显著性($P>0.05$),其余治疗组 T₃ 值与模型组比较差异无显著性($P>0.05$);各治疗组 T₄ 与模型组比较差异无显著性($P>0.05$),与正常对照组比较差异有

表 1 对骨骼肌 GluT 4 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	骨骼肌 GluT 4 mRNA
模型组	10	0.0952±0.0533 *
西药组	10	0.1984±0.0820 *
右归丸低剂量组	10	0
右归丸中剂量组	10	0.5982±0.2348△
右归丸高剂量组	10	0.5272±0.2116△
中西药合用组	10	0.6257±0.1679△
自拟方组	10	0.1274±0.0386 *
正常对照组	10	0.6627±0.1533△

与正常对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.01$

表 2 成模后各组甲状腺功能比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	FT ₄ (pmol/L)	FT ₃ (pmol/L)	sTSH (mIU/ml)
模型组	10	3.01±1.10 *	0.59±0.15 *	35.16±8.19 *
西药组	10	2.84±0.77 *	0.68±0.23 *	32.44±8.88 *
右归丸低剂量组	10	3.50±1.84 *	0.68±0.28 *	29.41±8.24 *
右归丸中剂量组	10	2.99±0.75 *	0.56±0.20 *	34.64±6.17 *
右归丸高剂量组	10	2.97±1.30 *	0.63±0.17 *	34.46±7.23 *
中西药合用组	10	2.95±1.29 *	0.74±0.18 *	33.28±10.33 *
自拟方组	10	2.39±0.52 *	0.61±0.20 *	29.30±8.31 *
正常对照组	10	37.40±6.55	5.71±0.89	1.76±0.44

与正常对照组比较,* $P<0.01$

显著性($P<0.01$),均未恢复正常;西药组、中西药合用组 sTSH 与模型组比较明显下降($P<0.01$),与正常对照组比较差异无显著性($P>0.05$),其余治疗组与模型组比较差异无显著性($P>0.05$),与正常对照组比较差异有显著性($P<0.01$)。

4 讨论

甲减属中医学“虚劳”、“水肿”范畴,其主要病因病机为肾阳虚衰,气化失职。肾阳是生命活动的动力和源泉,而人体生命活动与激素的调节密切相关。甲状腺激素合成、分泌或生物效应不足,均可导致垂体前叶、性腺、心脏、肌肉等脏器组织的一系列病变,在临床上产生相应的症状和体征,与肾虚出现的全身功能低下并伴见寒象的证候表现相似。近年来,运用中医药治疗本病的报道日益增多,相关临床研究、实验研究也取得一定进展。

表 3 治疗 8 周后各组甲状腺功能比较($\bar{x} \pm s$)

分组	鼠数	FT ₄ (pmol/L)	FT ₃ (pmol/L)	T ₃ (nmol/L)	T ₄ (nmol/L)	sTSH(uIU/ml)
模型组	10	18.34±5.65	2.59±0.74	0.83±0.20	23.85±11.58	13.63±21.88
西药组	10	17.62±2.94 **	2.97±0.58 *	0.88±0.09 **	22.52±4.93 **	2.69±2.56△△
右归丸低剂量组	10	19.15±3.98 **	3.38±0.50△	1.04±0.12△	30.36±7.51 **	6.97±5.83 **
右归丸中剂量组	10	19.81±7.34 **	3.61±1.01△	1.06±0.29△	31.64±4.50 **	11.30±13.06 **
右归丸高剂量组	10	13.35±4.89 **	2.86±1.03 *	0.82±0.26 **	16.94±6.16 **	14.62±10.37 **
中西药合用组	10	19.93±4.80 **	3.50±0.77△	1.05±0.13△	27.84±6.32 **	3.41±10.86△△
自拟方组	10	18.72±6.20 **	3.43±0.87△	1.00±0.23△	27.83±11.11 **	10.85±10.86 **
正常对照组	10	33.20±7.12	3.83±1.19	1.16±0.15	50.27±18.03	0.90±0.31

与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

右归丸系明代著名医家张介宾所拟,是治疗肾阳不足,命门火衰的常用方。方中熟地黄味甘而性微温,归肝、肾经,补精益髓,养血滋阴,重用之滋补肾阴以助阳,乃“阴阳互根”、“善补阳者必于阴中求阳”之意;附子、肉桂性味辛热,归心、肾、脾经,有温肾助阳散寒之功;鹿角胶咸寒纯阳,为血肉有情之品,补肾而温督脉,生精血而强筋骨,与附子、肉桂合用,温补肾阳,填精补髓,与熟地黄合用,有温阳补血之特长,刚柔相济之妙用;山药、山茱萸、枸杞子滋养肝肾而涩精,菟丝子温补肾阳,当归、杜仲养血强筋,为本方辅佐。诸药合用,共奏温补元阳之功。经临床验证,右归丸治疗甲减能显著改善患者的临床症状,疗效颇佳。

葡萄糖是各种细胞最重要的能量来源,大多数组织细胞以易化扩散的方式顺浓度梯度摄入细胞外的葡萄糖,这一转运过程不消耗能量,而负责这一转运过程的分子是葡萄糖转运蛋白家族(GluTs)^[6]。在机体组织细胞的葡萄糖转运过程中,GluT 4 的作用最为重要。GluT 4 主要分布于骨骼肌、心肌、脂肪细胞,是胰岛素敏感的反应性葡萄糖转运体。Torrance 等^[7]对甲亢大鼠肌肉组织中的 GluT 4 mRNA 和蛋白质水平进行研究后发现,红色肌肉组织中的 GluT 4 mRNA 较正常升高 2.5 倍,蛋白质水平较正常升高 10 倍。本研

究发现,模型组大鼠的骨骼肌 GluT 4 mRNA 表达显著降低,约相当于正常表达水平的 14.37%。经治疗后右归丸中剂量组、右归丸高剂量组、中西药合用组明显提高,大致恢复正常;而西药组、右归丸低剂量组、自拟方组与模型组相比无明显变化。说明中药右归丸能上调甲减大鼠骨骼肌 GluT 4 mRNA 表达水平,促进骨骼肌对葡萄糖的转运,从而改善骨骼肌细胞的能量代谢,这可能是中药能有效治疗甲减的作用机理之一。

参考文献

- 1 朱章志,熊曼琪.三黄降糖方对 2 型糖尿病患者外周胰岛素抵抗的影响.中国中西医结合杂志,1997,17(10):590~593.
- 2 孙敬方主编.动物实验方法学.北京:人民卫生出版社,2001:489~490.
- 3 施新猷主编.现代医学动物学.北京:人民军医出版社,2000:480~481.
- 4 李英,白雪梅,周轩生,等.实验性甲低大鼠甲状腺内肥大细胞的形态学研究.中国地方病杂志,1995,10(3):139~140.
- 5 贺石林.中医科研设计与统计方法.长沙:湖南科学技术出版社,1988:54.
- 6 Mueckler M.Facilitative glucose transporters.Eur J Biochem,1994,219(3):713~725.
- 7 Torrance CJ,Devente JE,Jones JP,et al.Effects of thyroid hormone on GLUT 4 glucose transporter gene expression and NIDDM in rats.Endocrinology,1997,138(3):1204~1214.

欢迎订阅 2007 年《中医杂志》

《中医杂志》由中华中医药学会和中国中医科学院联合主办,从 1955 年创刊以来始终坚持“以提高为主,兼顾普及”的办刊方针,是我国中医药界创刊早、发行量大、具有较高权威性和学术影响的国家级医药期刊。是中国自然科学核心期刊,首届国家期刊奖获得者。2007 年《中医杂志》正文将增至 96 页,内容将做重大调整和充实。中医药界的重大研究进展和动态、最新成果等将及时得到反映。本刊主要栏目中“当代名医”和“临证心得”介绍名老中医辨证用药治疗疑难病的经验,即学即用;“专题笔谈”介绍常用中药应用的新经验,启发思路;“临床研究”介绍中医药治疗的新方法、新成果,真实可靠;“临床解惑”回答读者遇到的各类疑难问题,深入浅出。此外,还辟有病例讨论、针灸经络、思路与方法、综述、百家园、中医教学等栏目。读后可使您掌握最新信息与治疗方法,成为您学习中医药、研究中医药,不断提高临床及研究水平的良师益友。

《中医杂志》(月刊,大 16 开本,96 页),2007 年每册 8.80 元,全国各地邮局办理订阅,邮发代号:2-698,国外代号:M 140

《中医杂志》英文版(季刊),本刊自办发行,每册定价 22.00 元。

地址:北京东直门内南小街 16 号,邮编:100700,电话:(010) 64035632。

网址: <http://www.jtcn.net.cn> E-mail: jtcn@188.com All rights reserved. <http://www.cnki.net>