疏肝健脾方对慢性应激糖尿病大鼠甲状腺功能及组织形态的影响

雷永华[1]　李　红[2]　徐蓉娟[2]　范崇信[1]

(1.郑州市第一人民医院,河南郑州 450000; 2.上海中医药大学附属龙华医院,上海 200032)

摘　要　目的:观察疏肝健脾方对糖尿病大鼠慢性应激状态下甲状腺功能及组织形态的影响。方法:将75只SD大鼠随机分为正常组15只和造模组60只,造模组60只大鼠诱发糖尿病后再次随机分为模型组、中药组、西药组和中西药结合组,除正常组以外其余各组大鼠在施以慢性不可预知温和刺激以诱发应激状态(4周)同时分别给予蒸馏水、疏肝健脾方、左洛复混悬液、疏肝健脾方+左洛复混悬液灌胃,正常组亦给予蒸馏水灌胃。治疗12周后测定各组大鼠三碘甲状腺原氨酸(T3)、四碘甲状腺原氨酸(T4)、游离甲状腺素T3(FT3)、游离甲状腺素T4(FT4)、促甲状腺激素(TSH)水平,并观察甲状腺组织改变。结果:与正常组比较,其余各组大鼠的T3、T4、FT3、FT4均明显降低;中西药结合组大鼠的T3、中药组和中西药结合组的T4均明显高于模型组和西药组。模型组大鼠甲状腺组织有不同程度损伤,各用药组损伤情况介于正常组与模型组之间。结论:疏肝健脾方能对抗链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病大鼠应激状态下并发的甲状腺功能减退,可能对糖尿病大鼠应激状态及下丘脑-垂体-甲状腺轴(HPT)有一定的调节作用。

关键词　糖尿病　甲状腺　疏肝健脾　中药复方　实验研究

中图分类号　R587.105　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　1672-397X(2014)10-0072-03

"疏肝健脾方"由上海中医药大学附属龙华医院徐蓉娟教授及其博士生李红主任医师经多年临床实践研制而成,广泛用于临床。该方具疏肝解郁、健脾安神之功效,拓展了应用疏肝健脾法治疗糖尿病及其合并症的临床思路。前期研究表明,疏肝健脾方具有改善糖尿病大鼠甲状腺功能减退的治疗作用[1],本实验通过观察疏肝健脾方对应激状态下糖尿病大鼠甲状腺功能及病理改变的影响,进一步探讨疏肝健脾方对应激状态下糖尿病大鼠合并甲状腺功能减退的干预作用,并进而探索其相关机制。

1　实验材料

1.1　动物　SPF级SD雄性大鼠75只,体重(180±10)g,由上海中医药大学实验动物中心提供。

基金项目:国家自然科学基金项目(30772800)

学学报(医学版),2001,22(3):73

[6] 赵刚,李树清.兴奋性氨基酸毒性与缺血性脑损伤.国外医学(脑血管疾病分册),2004,12(6):426

[7] 牛文民,李忠仁.缺血性脑血管病自由基损伤病原学及抗氧化治疗研究进展.上海针灸杂志,2005,24(1):43

[8] 虞希冲.谷氨酸转运体、谷氨酸/胱氨酸转运体与谷氨酸神经细胞毒作用.中国临床药理学与治疗学,2003,8(5):490

[9] 樊敬峰,王伟斌,吕佩源,等.谷氨酸受体通路及其功能研究进展.疑难病杂志,2005,4(5):313

[10] 宋文婷,徐立,刘建勋,等.脑缺血后谷氨酸及其受体介导的神经细胞损伤及相关药物研究进展. 中国药理学通报,2012,28(6):747

[11] 陆钦池,陈生弟.代谢型谷氨酸受体与癫痫的研究进展.神经病学与神经康复学杂志,2006,3(2):104

[12] 张毅,苏敏,秦洁行,等.缺血再灌注大鼠脑内代谢型谷氨酸受体Ⅰ和代谢型谷氨酸受体5的mRNA水平变化.脑与神经疾病杂志,2005,13(4):264

[13] Dölen G,Bear MF . Role for metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) in the pathogenesis of fragile X syndrome. J Physiol,2008,586(6):1503

[14] 杨巧莲,张茂林,刘莺,等.局灶脑缺血大鼠代谢型谷氨酸受体5mRNA表达及意义.中风与神经疾病杂志,2008,25(6):684

[15] 陈继军,李随芬,李超,等.选择性代谢性谷氨酸受体5激动剂CHPG对创伤性神经元损伤的保护作用研究.现代生物医学进展,2011,11(24):4808

[16] 刘悦,杨海涛,邝伟川,等.针刺对缺血性脑血管病模型大鼠脑组织代谢型谷氨酸受体的影响.世界中医药,2013,8(2):193

第一作者:赵海军(1978-),男,博士,讲师,研究方向:血瘀证及活血化瘀治法机制研究。

通讯作者:王世军,pathology@163.com

收稿日期:2014-05-09

编辑:吴　宁

1.2 造模用药 福氏佐剂、链脲佐菌素(STZ)均为美国 sigma 公司产品。

1.3 治疗用药 疏肝健脾方,药物组成:柴胡 12g、黄芪 30g、茯苓 15g、淮小麦 30g、石菖蒲 15g、丹参 15g,由上海中医药大学附属龙华医院制剂室按既定工艺完成并提供。左洛复:由辉瑞制药有限公司提供,50mg/片。

1.4 主要试剂盒及仪器 三碘甲状腺原氨酸(T3)、四碘甲状腺原氨酸(T4)、游离甲状腺素 T3(FT3)、游离甲状腺素 T4(FT4)、促甲状腺激素(TSH)放射免疫分析药盒等,由北京普尔伟业生物有限公司解放军总医院科技开发中心放免所提供。GC-911r 放射免疫计数器,由科大创新股份有限公司中佳分公司生产。

2 实验方法

2.1 糖尿病造模 大鼠适应性喂养 1 周后开始造模。先腹腔注射 0.5mL 福氏佐剂,次日再按 30mg/kg 体重腹腔注射 STZ 溶液(用 PH4.2 0.1mL/L 无菌枸橼酸钠缓冲液配制)。每周 1 次,连续 3 周重复上述步骤。每次注射后均测定血糖和体重。血糖>16mmol/L 为糖尿病模型造模成功。

2.2 糖尿病应激状态模型诱发 糖尿病造模成功的大鼠第 3 天开始给予慢性不可预知温和应激刺激,刺激方式包括制动 3h、潮湿笼子 17h、倾斜笼子 17h、通宵照明、禁食 24h、禁水 16h 加 1h 空瓶刺激、成组饲养 17h,以上刺激安排于 1 周内,每日 1 种,连续 4 周,同种刺激不连续出现。4 周后观察大鼠体重、摄食量变化,并行旷场行为测定观察大鼠运动能力、探索行为、侵犯攻击能力、清洁动作次数等情况的变化。

2.3 分组与用药 75 只 SD 大鼠先用随机数字表法选取 15 只作为正常组,剩余 60 只大鼠诱发糖尿病,造模成功 44 只,再次随机分为模型组、中药组、西药组、中西药结合组,每组 11 只。除正常组外其余各组大鼠均施以慢性不可预知温和刺激,同时中药组、西药组、中西药结合组分别给予疏肝健脾方、左洛复混悬液、疏肝健脾方+左洛复混悬液灌胃,正常组与模型组给予蒸馏水灌胃。疏肝健脾方参照标准动物的等效剂量折算系数法[2],每只大鼠给予 0.1053g/(kg·d)的生药量,相当于成人每日中药用量。左洛复片混悬于 CMC 溶液中,相当于成人 50mg/d 用量。各组大鼠均按体重灌胃,每日 1 次,连续给药 12 周。整个实验过程中,大鼠有一定的死亡率,且因试剂有限,最终随机选取了部分大鼠进行本研究相关指标的测定。

2.4 甲状腺激素指标测定 实验结束后所有大鼠施行麻醉后腹主动脉采血,放入不添加任何抗凝剂的试管中,4℃ 3000r/min 离心 15min,分离 1mL 血清放置-20℃冰箱保存,用于测定 T3、T4、FT3、FT4 和 TSH。测定严格按照试剂盒说明书进行操作。

2.5 甲状腺组织标本测定 所有大鼠腹主动脉取血后处死,迅速取出大鼠甲状腺,肉眼观察大体情况,在冰板上去除其周围其他组织,用预冷的生理盐水洗净血液,滤纸拭干,置福尔马林中性固定液(15%)浸泡固定,常规病理组织切片,梯度酒精常规脱水、蜡块包埋后 HE(苏木素-伊红)染色,光镜观察组织大体形态,上皮细胞及滤泡病理变化。

2.6 统计学方法 实验数据采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。计量资料符合正态分布的采用 t 检验和单因素方差分析,不符合正态分布的采用秩和检验。采用 95%CI 对统计量的参数进行估计,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 药物对糖尿病应激大鼠甲状腺功能的影响 见表 1。

表 1 各组大鼠药物干预后 T3、T4、FT3、FT4、TSH 含量比较[$\bar{x}\pm s$(平均秩次)]

组别	动物数(只)	T3(ng/mL)	T4(ng/mL)	FT3(ng/dL)	FT4(ng/dL)	TSH(uIU/mL)
正常组	6	1.51±0.11 (30.50)	66.74±28.17 (28.67)	3.70±0.75 (30.50)	9.06±1.43 (30.50)	10.87±1.45 (20.50)
模型组	6	0.33±0.29 (6.50)**	7.95±8.03 (7.33)**	1.05±0.55 (17.25)**	1.63±0.60 (10.50)**	17.54±13.67 (26.00)**
中药组	6	0.63±0.90 (13.33)**	25.45±2.99 (22.50)**#△	1.01±0.42 (15.67)**	2.53±0.90 (17.00)**	8.17±0.81 (8.67)**##
西药组	6	0.48±0.29 (11.58)**	5.78±4.32 (6.33)**	0.69±0.49 (9.83)**	2.05±1.29 (12.33)**	8.65±5.05 (14.33)
中西药结合组	9	0.83±0.12 (21.06)**##	23.45±8.55 (19.11)**#△	0.92±0.41 (13.50)**	2.49±1.37 (15.44)**	10.08±2.75 (17.50)

注:与正常组比较,**$P<0.01$;与模型组比较,#$P<0.05$,##$P<0.01$;与西药组比较,△$P<0.05$。

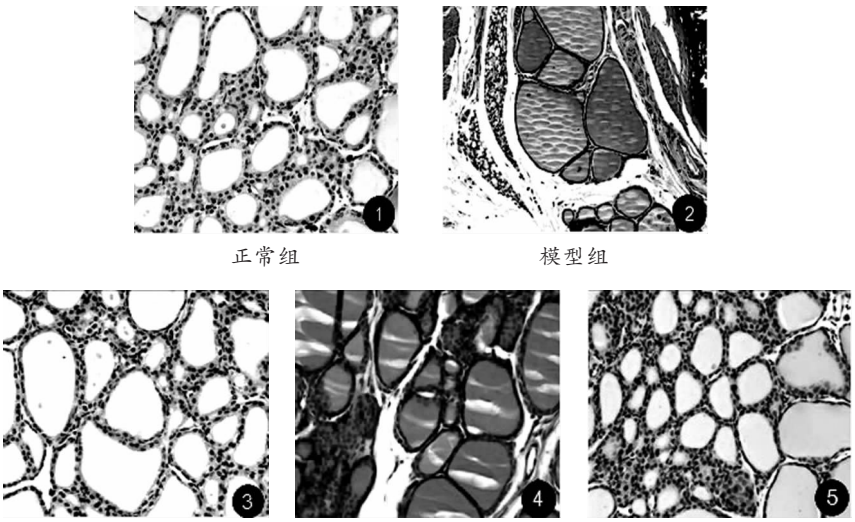
3.2 药物对糖尿病应激大鼠甲状腺组织结构的影响 光镜下观察各组大鼠甲状腺组织,发现模型组大鼠甲状腺滤泡上皮细胞厚度较正常组大鼠明显变薄,滤泡内胶体面积增大。各用药大鼠甲状腺组织结构改变情况介于正常组与模型组之间,以中西药结合组大鼠甲状腺组织结构最接近正常组,其次为中药组。西药组与正常组大鼠甲状腺组织结构差异较大,比较接近模型组大鼠甲状腺组织结构特点。见图 1。

4 讨论

糖尿病(DM)患者常出现 HPT 轴功能异常,国外流行病学研究发现 DM 人群中甲状腺功能异常的发生率明显增高,是非 DM 患者的 2~3 倍[3]。2 型 DM 患者合并亚临床甲减会增加 DM 并发肾病及心血管病变的危险性[4]。Mohn A 等[5]发现亚临床甲减会增加青少年Ⅰ型 DM 患者临床症状性低血糖的危险性,甚至严重者会诱发 DM 酮症酸中毒。

糖尿病属中医“消渴病”范畴,历代医家早有从肝论治消渴之说,清代医家黄坤载明确提出:“消渴者,足厥阴之病也”,开创了“从肝论治糖尿病”的先河。甲减与消渴中医证型关系密切,结合甲减的临床征象,DM 所致甲减与肝脾关系密切,肝郁日久,肝木亢盛,肝旺犯脾,进而致脾失健运,痰湿内生,出现一系列低代谢症候群,治疗应以疏肝健脾为主。根据经络理论,肝经“循喉咙之后”,甲状腺位于足厥阴肝经循行路线上。从神经内分泌调节来看,肝失疏泄常表现为抑郁或烦躁等精神状态的改变,而在这种情绪刺激的应

激过程中，甲状腺激素起着重要调节作用。临床观察，肝失疏泄之抑郁与甲状腺功能减低的临床表现相似。近年来从疏肝健脾论治糖尿病合并甲减逐渐引起中医界的关注，但是从肝脾论治糖尿病合并甲减的相关实验为数甚少。本实验所用疏肝健脾方中柴胡舒肝解郁，黄芪补气升阳、益卫固表、敛疮生肌、利水消肿，二者共为君药。淮小麦养心除烦、益肾、除热、止渴，治脏躁、烦热、消渴；石菖蒲辛、温，归心、胃经，开窍、豁痰、理气、活血、散风、去湿，二者共为臣药。丹参活血宁心，茯苓渗湿利水、益脾和胃、宁心安神，共为佐药。全方配伍，共奏疏肝解郁、宁心安神之效，诸药相得益彰。



正常组　模型组

中药组　西药组　中西药结合组

图 1　各组大鼠甲状腺组织病理改变(HE 染色，×400)

近年研究发现，应激刺激会影响机体甲状腺激素水平，总体而言，伤害性应激短期使甲状腺激素水平升高，而长期使之下降。甲状腺激素水平下降的机制可能与神经内分泌轴如 HPA 轴的兴奋有关。有研究显示其机制为脑中蓝斑核对应激做出最初反应后作用于下丘脑室旁核(PVN)，刺激其促肾上腺皮质激素释放因子(CRH)，CRH 使腺垂体分泌ACTH，从而作用于肾上腺皮质，释放糖皮质激素(GC)。GC 可抑制 TRH 和 TSH 的分泌，阻碍 T4 向 T3 转化，这与长期应激常导致的甲状腺激素，尤其是 T3 的降低密切相关[6]。高氏等[7]观察到，应激组大鼠血清中 TT3、TT4、FT3、FT4 和 TSH 的含量均显著低于对照组，说明慢性社会应激(CSS)抑制了 HPT 轴活动。TH 水平对下丘脑、垂体存在反馈调节，形成 HPT 轴调节通路，CSS 有可能影响这一负反馈调节机制。

本实验结果显示，糖尿病大鼠应激状态下存在甲状腺功能减退，中药及中西药合用可升高糖尿病应激大鼠 T3、T4 水平，降低 TSH 水平，在一定程度上改善甲状腺功能减退，提示疏肝健脾方对于糖尿病大鼠应激状态下甲状腺激素水平起到一定的调节作用。从 TSH 水平看，可能有负反馈机制参与其中，但因实验样本量偏少，尚需进一步验证。

综上，糖尿病大鼠在慢性不可预知温和刺激下出现甲状腺功能减退，其原因可能因高血糖状态合并应激状态下 HPA 轴被激活，体内神经内分泌激素分泌失调，HPT 轴也受影响，激素之间相互拮抗，CRH 抑制 TSH，进而引起甲状腺功能低下。因本实验缺少对 HPT 轴上游调节指标，如 CRH、TRH 等的检测，故糖尿病出现甲减的发病机制，尚需进一步实验阐明。本实验表明，疏肝健脾方能在一定程度上调节应激状态下糖尿病大鼠甲状腺激素水平，对改善糖尿病大鼠机体内环境起到一定作用，至于慢性不可预知温和刺激是否加重糖尿病大鼠甲状腺功能减退，尚需进一步实验分析验证。

5　参考文献

[1] 雷永华，李红，徐蓉娟.疏肝健脾方对糖尿病大鼠甲状腺功能减退的影响.实用医学杂志，2012，28(24)：4053

[2] 陈奇. 中药药理研究方法学. 北京：人民卫生出版社，2000，33，1103

[3] VondraK，Vrbikova J，Dvorakova K.Thyroid gland disease in adult patients with diabetes mellitus.Minerva Endocrinol，2005，30：217

[4] Chen H，Wu T，Jap T，et al.Complications Subclinical hypo-thyroidism is a risk factor for nephropathy and cardiovascular diseases in Type 2 diabetic patients. Diabetic Medicine，2007，24：1336

[5] Mohn A，Michele S，Luzio R.The effect of subclinical hypo-thyroidism on metabolic control in children and adolescents with Type 1 diabetes mellitus. Diabetic Medicine，2002：70

[6] 李舍予，李佳，岳利民.应激对血浆甲状腺激素水平的影响.四川生理医学杂志，2007，29(4)：176

[7] 高雪，刘燕，朱广瑾，等.慢性社会应激对大鼠神经内分泌及行为的影响.基础医学与临床，2003，23(3)：347

第一作者：雷永华(1981-)，女，医学博士，主治医师，研究方向：中西医结合治疗内分泌代谢疾病。

通讯作者：徐蓉娟，xrj1118@yahoo.com.cn

收稿日期：2014-05-22

编辑：吴　宁

中医药学——中华文明的结晶，世界文化的瑰宝！