

儿茶素和左甲状腺素钠对甲状腺功能减退大鼠抗氧化应激能力改善的影响

寿盼盼, 潘天荣, 钟兴, 吕珊珊

摘要 目的 观察左甲状腺素钠、儿茶素以及两药联合治疗对甲状腺功能减退模型大鼠血清 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)、对氧磷酶-1 含量的影响以及海马组织凋亡蛋白 caspase-3 含量的影响。方法 选取 50 只成年 SD 雄性大鼠, 随机选取 10 只作为对照组, 剩余 40 只用丙基硫氧密啶(PTU) 诱导甲状腺功能减退大鼠模型, 分为 PTU 组、儿茶素组、左甲状腺素钠组(L-T4 组)、左甲状腺素钠 + 儿茶素组(联合用药组)。采用酶联免疫吸附试验测定各组大鼠血清 8-OHdG、对氧磷酶-1 水平。采用 Western blot 测定各组大鼠海马组织凋亡蛋白 caspase-3 的含量。结果 ① 与对照组比较, PTU 组大鼠血清 8-OHdG 含量和海马组织凋亡蛋白 caspase-3 含量显著升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 与 PTU 组比较, L-T4 组、联合用药组大鼠血清 8-OHdG 含量和海马组织凋亡蛋白 caspase-3 含量显著降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。② 与对照组比较, PTU 组大鼠血清对氧磷酶-1 含量显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与 PTU 组比较, L-T4 组、联合用药组大鼠血清对氧磷酶-1 含量显著升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 甲状腺功能减退可导致抗氧化应激能力下降以及细胞凋亡的增加, 左甲状腺素钠、儿茶素药物治疗可改善氧化应激、减少细胞凋亡, 两药联合使用有协同作用。

关键词 甲状腺功能减退; 左甲状腺素钠; 儿茶素; 氧化应激; 细胞凋亡

中图分类号 R 581.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)03-0365-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.013

甲状腺功能减退症简称甲减, 是由各种原因导致的低甲状腺激素血症或甲状腺激素抵抗而引起的全身性低代谢综合征。有研究^[1-2]表明, 甲减时伴有氧化应激损伤, 可能会影响脑组织的功能。儿茶素, 又称儿茶酚, 是天然的油脂抗氧化剂。儿茶素能够通过增加总超氧化物歧化酶(tSOD) 与谷胱甘肽

过氧化物酶(GSH-PX) 的活性, 有效地清除-OH 与丙二醛(MDA), 改善肾病综合征大鼠的肾功能^[3]。Choi et al^[4] 研究发现口服低剂量的儿茶素能够预防小鼠黑质中多巴胺能神经元丢失, 从而对帕金森病有保护作用。目前尚未见有关儿茶素对甲减大鼠氧化应激影响的报道, 该研究通过抗氧化剂儿茶素和左甲状腺素钠联合治疗甲减大鼠, 检测大鼠血清反映氧化应激损伤的指标 8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-2 deoxyguanosine, 8-OHdG)、对氧磷酶-1 的变化以及大鼠海马组织凋亡蛋白 caspase-3 的变化。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 实验动物 清洁级成年 SD 雄性大鼠 50 只, (190 ± 10) g, 购自安徽医科大学实验动物中心。用标准鼠笼分笼饲养, 每笼饲养 5 只, 大鼠均自由摄食、饮水, 日照, 温度保持在 20 ~ 25 °C, 相对湿度保持在 40% ~ 50%, 定时通风换气、更换垫料。

1.1.2 主要药物 丙基硫氧密啶(propylthiouracil, PTU) 由上海朝晖药业有限公司生产; 左甲状腺素钠(levothyroxine sodium, L-T4) 由德国默克公司生产; 儿茶素由上海绿叶公司生产。

1.1.3 主要试剂与器材 化学发光免疫分析系统为德国拜尔公司 ADVIA Centaur 系统; 8-OHdG、对氧磷酶-1 试剂盒均由上海源叶生物技术公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型的建立 SD 大鼠适应性喂养 10 d 后, 随机选取 10 只作为对照组, 其余为实验组: PTU 组、儿茶素组、左甲状腺素钠组(L-T4 组)、左甲状腺素钠 + 儿茶素组(联合用药组), 每组 8 只。对照组饮用水给予消毒无菌水, 实验组饮用消毒无菌水中按 0.05% (W/V) 加入 PTU。4 周后除对照组外, 实验组大鼠出现动作迟缓、反应迟钝、进食饮水等较前减少。随机从实验组中各选取 4 只大鼠断尾取血测定血清甲状腺激素水平, 三碘甲状腺原氨酸(three triiodothyronine, T3) < 1.3 nmol/L, 甲状腺激素(thyroxine, T4) < 66 nmol/L, 促甲状腺激素(thyrotropine,

2016-12-30 接收

基金项目: 国家中医药管理局重点学科 - 中医内分泌学科开放基金项目(编号: 2011NFMXK009)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院内分泌科, 合肥 230601

作者简介: 寿盼盼, 女, 硕士研究生;

潘天荣, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: ptr1968@163.com

TSH) >4.2 mIU/L,具备三项视为甲减造模成功。

1.2.2 实验组给药 经甲状腺功能测定后,40 只实验大鼠中只有其中的 32 只造模成功。各实验组饮用水仍为按 0.05% (W/V) 加入 PTU 的消毒无菌水,儿茶素组大鼠按 25 mg/g 儿茶素灌胃,L-T4 组按 0.02 μg/g L-T4 灌胃,联合用药组给予 25 mg/g 儿茶素 +0.02 μg/g L-T4 灌胃,对照组给予生理盐水灌胃,连续 4 周后采集标本。由于课题是在冬季进行,PTU 组、儿茶素组大鼠抵御寒冷的能力较对照组明显下降,导致这两组大鼠剩余较少。

1.2.3 标本采集 称取大鼠体重,用 10% 水合氯醛 0.3 ml/100 g 腹腔注射麻醉,腹主动脉取血,离心后取上清液,然后将大鼠断头处死,取出海马组织。

1.2.4 指标测定 采用直接化学发光法测定大鼠血清甲状腺激素水平;采用酶联免疫吸附试验测定大鼠血清 8-OHdG、对氧磷酶-1 水平;采用 Western blot 法测定大鼠海马组织凋亡蛋白 caspase-3 的含量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;采用独立样本 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠甲状腺激素水平的比较 ① 与对照组相比,PTU 组和儿茶素组 T3 和 T4 水平明显降低,TSH 明显升高,差异有统计学意义 (*P* < 0.01); L-T4 组和联合用药组 T3、T4 和 TSH 差异无统计学意义。② 与 PTU 组比较,L-T4 组和联合用药组 T3 和 T4 水平明显升高,TSH 明显降低,差异有统计学意义 (*P* < 0.05); PTU 组与儿茶素组 T3、T4 和 TSH 差异无统计学意义。③ L-T4 组与联合用药组相比,T3、T4 和 TSH 差异无统计学意义。见表 1。

2.2 各组大鼠血清 8-OHdG、对氧磷酶-1 水平的比较 ① 与对照组相比,PTU 组和儿茶素组 8-OHdG 含量明显升高,对氧磷酶-1 含量明显降低,差异有统计学意义 (*P* < 0.001); L-T4 组和联合用药组 8-OHdG 和对氧磷酶-1 含量差异无统计学意义。② 与 PTU 组比较,L-T4 组和联合用药组 8-OHdG 含量明显降低,对氧磷酶-1 含量明显升高,差异有统计学意义 (*P* < 0.001); PTU 组和儿茶素组 8-OHdG 和对氧磷酶-1 含量差异无统计学意义。③ L-T4 组与联合用药组相比,8-OHdG 和对氧磷酶-1 含量差异无统计学意义。与 PTU 组比较,儿茶素组 8-OHdG 含量有所降低,对氧磷酶-1 含量有所升高,但差异均无统计学意义。见表 2。

2.3 各组大鼠海马组织凋亡蛋白 caspase-3 含量的比较 ① 与对照组相比,PTU 组和儿茶素组海马组织凋亡蛋白 caspase-3 含量显著增加,差异有统计学意义 (*P* < 0.001); L-T4 组和联合用药组 caspase-3 含量差异无统计学意义。② 与 PTU 组相比,L-T4 组和联合用药组 caspase-3 含量显著降低,差异有统计学意义 (*P* < 0.001)。③ L-T4 组与联合用药组比较,凋亡蛋白 caspase-3 的含量差异无统计学意义。图 1。

3 讨论

本研究综合分析了甲状腺功能减退大鼠经 L-T4、儿茶素以及两药联合治疗后血清反映氧化应激的指标 8-OHdG、对氧磷酶-1 和海马组织凋亡蛋白 caspase-3 的含量相对于正常对照组以及未经药物治疗的甲减大鼠变化的情况。结果显示左甲状腺素钠、儿茶素对甲减大鼠都具有抗氧化应激损伤的作用,两药联合治疗则具有协同作用。

8-OHdG 是活性氧簇作为体内 DNA 氧化损

表 1 各组大鼠甲状腺激素水平的比较($\bar{x} \pm s$)

指标	PTU 组 (n=4)	儿茶素组 (n=5)	L-T4 组 (n=7)	联合用药组 (n=8)	对照组 (n=8)
T3 (nmol/L)	0.41 ± 0.23**	0.45 ± 0.24**	1.29 ± 0.22#	1.38 ± 0.21#	1.39 ± 0.25
T4 (nmol/L)	31.27 ± 21.36**	24.60 ± 11.17**	72.58 ± 29.24#	85.33 ± 31.64#	90.37 ± 31.27
TSH (mIU/L)	7.50 ± 1.67**	6.87 ± 2.08**	1.76 ± 0.25#	1.59 ± 0.30#	1.04 ± 0.15

与对照组比较: ** *P* < 0.01; 与 PTU 组比较: # *P* < 0.05

表 2 各组大鼠血清 8-OHdG、对氧磷酶-1 水平的比较 (ng/ml, $\bar{x} \pm s$)

指标	PTU 组 (n=4)	儿茶素组 (n=5)	L-T4 组 (n=7)	联合用药组 (n=8)	对照组 (n=8)
8-OHdG	1.92 ± 0.23**	1.83 ± 0.28**	0.91 ± 0.25##	0.83 ± 0.22##	0.84 ± 0.27
对氧磷酶-1	1.35 ± 0.20**	1.40 ± 0.20**	2.36 ± 0.23##	2.43 ± 0.24##	2.50 ± 0.24

与对照组比较: ** *P* < 0.01; 与 PTU 组比较: ## *P* < 0.01

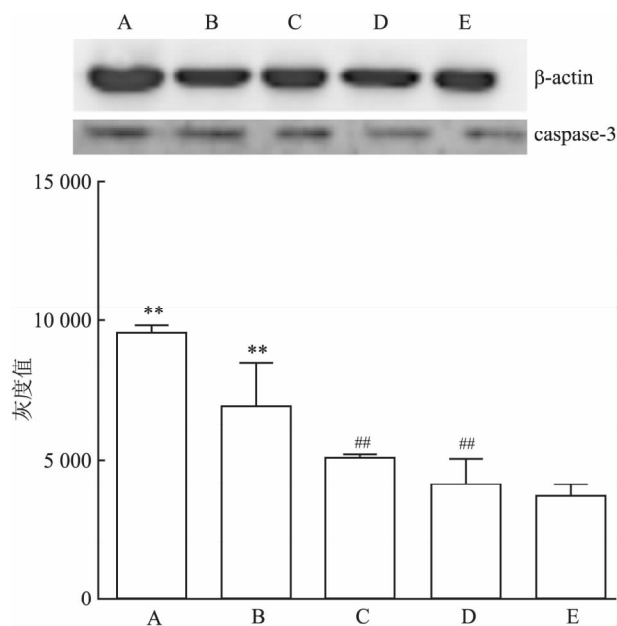


图1 各组大鼠海马组织凋亡蛋白 caspase-3 表达的比较

A: PTU 组; B: 儿茶素组; C: L-T4 组; D: 联合用药组; E: 对照组;
与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 PTU 组比较: ## $P < 0.01$

伤的一种重要的生物标志物,其含量可以反映机体的 DNA 损伤程度,已被国际上公认为评价机体 DNA 损伤和氧化应激状态的敏感指标。相关研究^[5]报道,8-OHdG 不仅反映整个机体平均的氧化损伤率,而且与糖尿病、癌症、心血管疾病的发生和发展有着密切的关系。高萍等^[6]相关研究结果提示,有机溶剂染毒的细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量增加,且 ROS 浓度与有机溶剂的浓度呈正相关性,而 ROS 水平与 8-OHdG 含量呈正相关性,加入抗氧化剂后其细胞内 8-OHdG 含量明显下降。本研究显示,PTU 组大鼠血清 8-OHdG 水平较对照组、L-T4 组、联合用药组显著升高。儿茶素组单药治疗与 PTU 组相比,血清 8-OHdG 水平呈降低趋势,联合左甲状腺素钠治疗后,血清 8-OHdG 水平进一步降低,提示 L-T4 和儿茶素能降低甲减所致的氧化应激水平。

对氧磷酶-1 是一类能催化磷酸酯键水解的芳香酯酶,主要在肝脏合成,广泛分布于各种组织。对氧磷酶-1 是一种依赖性糖蛋白,它与高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL) 中的 ApoA-I 紧密结合,具有水解氧化脂质、抑制低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL) 的氧化修饰,从而发挥抗氧化作用^[7]。它也是一种水解对硫磷的毒性代谢产物芳基酯酶,减少有机磷的神经毒性^[8]。大量研究^[9]

表明,糖尿病、多囊卵巢综合征、心脑血管疾病以及子痫前期患者的血清对氧磷酶-1 的含量及活性较正常人明显下降。对氧磷酶-1 下降可增加 1 型糖尿病患者视网膜病变的风险。甲减的低代谢状态会引起血脂增高,而脂代谢紊乱特别是 LDL-C 的增加以及 HDL-C 的降低是心脑血管疾病的重要危险因素。Boullier et al^[10]发现血清 HDL-C 的含量与血清对氧磷酶活性呈正相关性。Paragh et al^[11]临床研究亦发现,高脂血症患者对氧磷酶-1 活性降低。本研究显示,PTU 组大鼠血清对氧磷酶-1 水平明显降低,儿茶素组对氧磷酶-1 含量相比 PTU 组稍增高,联合用药组对氧磷酶-1 含量相比 PTU 组明显升高,与正常对照组则无明显差异,提示 L-T4 和儿茶素能改善甲减所致的抗氧化指标。

甲状腺激素在胚胎早起发育过程中起到重要作用,若缺乏则会严重影响神经系统的发育。Martinez et al^[12]研究显示,T3 可刺激小脑星型胶质细胞的增殖及分化。成年期甲减可导致中枢神经系统广泛的结构损害和功能紊乱,导致学习、记忆、执行功能等受损^[13],而海马区在学习、记忆、执行功能等方面扮演着重要角色。董静等^[14]研究结果提示,碘缺乏和甲状腺功能减退可下调海马 CA1 和 CA3 区钙调蛋白的表达。王萍等^[15]研究表明,碘缺乏、甲状腺功能减退可降低仔鼠海马组织原癌基因 c-fos、c-jun 表达,进而影响神经系统及智力发育。本研究结果也显示,PTU 组大鼠海马组织凋亡蛋白 caspase-3 水平较对照组明显升高,儿茶素组 caspase-3 含量稍增高,联合用药组 caspase-3 含量则与对照组无明显差异。

综上所述,本研究显示甲状腺功能减退可导致氧化应激损伤增加,从而导致细胞凋亡的增加;L-T4、抗氧化剂儿茶素治疗可提高抗氧化应激能力,减少细胞凋亡,两药联合使用有协同作用。

参考文献

- [1] Sarandöl E, Taş S, Dirican M, et al. Oxidative stress and serum paraoxonase activity in experimental hypothyroidism: effect of vitamin E supplementation [J]. Cell Biochem Funct, 2005, 23 (1): 1-8.
- [2] Rahaman S O, Ghosh S, Mohanakumar K P, et al. Hypo-thyroidism in the developing rat brain is associated with marked oxidative stress and aberrant intraneuronal accumulation of neurofilaments [J]. Neurosci Res, 2001, 40(3): 273-9.
- [3] 何小解,易著文. 儿茶素对肾病综合征大鼠血清氧自由基及抗氧化酶的影响[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2002, 11(4): 342-6.

- [4] Choi J Y, Park C S, Kim D J, et al. Prevention of nitric oxide-Me-diated 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease in mice by tea phenolic epigallocatechin 3-gal-late [J]. *Neurotoxicology*, 2002, 23(3): 367-74.
- [5] 高玉楠, 杨靖, 宋沁馨, 等. 8-OHdG 作为 DNA 氧化损伤标志物在疾病诊断中的应用 [J]. *药学与临床研究*, 2012, 20(3): 223-8.
- [6] 高萍, 何平, 王爱国, 等. PCB153 对 PBDE-47 致 SH-SY5Y 细胞氧化应激和 8-羟基脱氧鸟苷含量的影响 [J]. *卫生研究*, 2009, 38(5): 513-5.
- [7] Soyman Z, Noyan V, Tulmac M, et al. Serum Paraoxonase 1 activi-ty, asymmetric dimethylarginine levels, and brachial artery flow-mediated dilatation in women with polycystic ovary syndrome [J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(3): 1067-72.
- [8] La Du B N, Aviram M, Billecke S, et al. On the physiological role (s) of the paraoxonases [J]. *Chem Biol Interact*, 1999, 119-120(1): 379-88.
- [9] Kao Y L, Donaghue K, Chan A, et al. A variant of paraoxonase (PON1) gene is associated with diabetic retinopathy in T1DM [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83(7): 2589-92.
- [10] Boullier A, Hennuyer N, Tailleux A, et al. Increased levels of high-density lipoprotein cholesterol are ineffective in inhibiting the development of immune responses to oxidized low-density lipopro-tein and atherosclerosis in transgenic rabbits expressing human apo-lipoprotein (apo) A-I with severe hypercholesterolemia [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2001, 100(3): 343-55.
- [11] Paragh G, Seres I, Balogh Z, et al. The serum paraoxonase activi-ty in patients with chronic renal failure and hyperlipidemia [J]. *Nephron*, 1998, 80(2): 166-70.
- [12] Martinez R, Gomes F C. Proliferation of cerebellar neurons in-duced by astrocytes treated with thyroid hormone is mediated by a cooperation between cell contact and soluble factors and involves the epidermal growth factor-protein kinase A pathway [J]. *J Neurosci Res*, 2005, 80(3): 341-9.
- [13] Lee P R, Brady D, Koenig J I. Thyroid hormone regulation of N-methyl-D-aspartic acid receptor subunit mRNA expression in adult brain [J]. *J Neuroendocrinol*, 2003, 15(1): 87-92.
- [14] 董静, 刘万洋, 王毅, 等. 碘缺乏和甲状腺功能减退对大-鼠仔鼠海马钙调蛋白表达的影响 [J]. *毒理学杂志*, 2010, 39(2): 96-9.
- [15] 王萍, 殷洪博, 刘长晟, 等. 碘缺乏、甲状腺功能减退仔鼠海-马组织原癌基因 c-fos、c-jun 蛋白的表达 [J]. *中国地方病防治-杂志*, 2005, 20(1): 6-8.

Effect of catechin and levothyoxine on oxidative stress level in hypothyroidism rat

Shou Panpan, Pan Tianrong, Zhong Xing, et al

(Dept of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To observe the effects of levothyoxine, catechin and the two-drug combination therapy on the levels of 8-OHdG, PON-1 in the serum and caspase-3 in hippocampus tissue of hypothyroidism rat. **Methods** Fifty male SD rats were selected, ten of them were selected randomly as the normal group. The rest were performed to hypothyroidism models by adding propylthiouracil (PTU) in their daily drinking water, then divided them into four groups randomly: the hypothyroidism group (PTU group), the catechin group, the levothyoxine group (L-T4 group), two-drug combination group. The levels of 8-OHdG, PON-1 in the serum were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. The level of caspase-3 in hippocampus tissue was measured by Western blot. **Results** ① Compared with the normal group, the level of 8-OHdG in the serum and the level of caspase-3 in hippocampus tissue in the PTU group was both markedly higher ($P < 0.05$); compared with the PTU group, the level of 8-OHdG in the serum and the level of caspase-3 in hippocampus tissue in the L-T4 group and the two-drug combination use group was both markedly lower ($P < 0.05$). ② Compared with the normal group, the level of PON-1 in the serum in the PTU group were markedly lower ($P < 0.05$); compared with the PTU group, the level of PON-1 in the serum in the L-T4 group and the two-drug combination group were markedly higher ($P < 0.05$). **Conclusion** Hypothyroidism might decrease the ability of oxidative stress and increase the apoptosis. Levothyoxine and catechin might improve the ability of oxidative stress and decrease apoptosis. Furthermore, the two-drug combination therapy have an additive effect on improving the ability of oxidative stress and decreasing apoptosis.

Key words hypothyroidism; levothyoxine; catechin; oxidative stress; apoptosis