

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.32.006

左甲状腺素联合多奈哌齐对成年期甲状腺功能减退症大鼠的影响及机制探讨

冯佳¹, 马昌义¹, 张艳珍²

(1. 四川省宜宾市第二人民医院乳腺甲状腺科 644000; 2. 西南医科大学附属医院乳腺外科, 四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 探讨左甲状腺素联合多奈哌齐对成年期甲状腺功能减退症大鼠的影响及可能机制。**方法** SD 雄性大鼠 60 只,按随机数字表分为 A、B、C、D 组,每组 15 只。其中 B、C、D 组大鼠均采取 PLT 制备甲状腺功能减退模型,A 组作为正常对照。造模成功后 C 组和 D 组大鼠每日分别腹腔注射左甲状腺素(6 μg/100 g),D 组在 C 组的基础上给予在饮用水中加入 0.005% 多奈哌齐。2 周后,采用 Morris 水迷宫观察大鼠学习记忆行为;用放射免疫法测定血清甲 T₃、T₄ 水平;采用免疫组织化学法和 Western blot 法检测各组大鼠海马 syntaxin-1 的表达情况。**结果** B 组大鼠的逃避潜伏期和游泳路程明显延长,游泳速度明显变慢;C 组和 D 组的逃避潜伏期和游泳路程明显缩短,游泳速度明显增快;B 组的 T₃、T₄ 水平明显降低。C 组和 D 组的 T₃、T₄ 水平明显升高,其以 D 组升高最明显。免疫组织化学法和 Western blot 法结果显示 B 组大鼠海马内 syntaxin-1 表达水平低于对照组,C 组和 D 组大鼠海马内 syntaxin-1 表达水平明显升高。**结论** 左甲状腺素联合多奈哌齐可改善成年期甲状腺功能减退症大鼠的学习和记忆能力,其机制与升高海马组织 syntaxin-1 的表达有关。

[关键词] 左旋甲状腺素;多奈哌齐;甲状腺功能减退;突触融合蛋白 1;大鼠,Sprague-Dawley

[中图分类号] R581.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)32-4484-04

Effect of levothyroxine combined with donepezil hydrochloride in adult rats with hypothyroidism and its mechanism

Feng Jia¹, Ma Changyi¹, Zhang Yanzhen²

(1. Department of Breast and Thyroid Surgery, the Second People's Hospital of Yibin, Yibin, Sichuan 644000, China;

2. Department of Breast Surgery, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect and potential mechanism of levothyroxine combined with donepezil hydrochloride in adulthood hypothyroidism rats. **Methods** A total of 60 male SD rats was divided by random number table into group A, group B, group C and group D, 15 rats in each group. The rats in group B, group C and group D were treated with PLT to prepare hypothyroidism model, and group A was used as the control group. After successful preparation of the model, rats in group C and group D were injected intraperitoneally with levothyroxine(6 g/100 g) every day, and then group D was given another 0.005% donepezil in drinking water. After 2 weeks, the learning and memory behavior of rats was observed by Morris water maze; the levels of serum T₃ and T₄ were measured by radioimmunoassay; the expression of syntaxin-1 in hippocampus was detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results** The escape latency and swimming distance of rats were prolonged significantly in group B but shortened significantly in group C and group D, and swimming speed was significantly slowed in group B but significantly strengthened in group C and group D; the levels of T₃ and T₄ were obviously decreased in group B but increased significantly in group C and group D, especially in group D. The results of immunohistochemistry and Western blot showed that the expression level of syntaxin-1 in hippocampus of rats was lower in group B compared to control group but increased significantly in both group C and group D. **Conclusion** Levothyroxine combined with donepezil hydrochloride can improve the learning and memory ability in adult rats with hypothyroidism, and its mechanism is related to the increase of expression of synaptotagmin-1 in hippocampus.

[Key words] levothyroxine; donepezil hydrochloride; hypothyroidism; syntaxin-1; rats, Sprague-Dawley

甲状腺功能减退症(简称甲减),是指由多种因素引起甲状腺激素合成、分泌或生物效应不足,表现为以甲状腺功能减退为特点的临床综合征^[1]。甲状腺激素是三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine, T₃)和四碘甲状腺原氨酸(tetraiodothyronine, T₄)的总称,是体内最大的内分泌腺甲状腺所分泌的激素,在体内以游离或者与血清蛋白的形式存在。在人或动物生长发育的各个阶段,都不能缺少甲状腺激素。该激素在维持新陈代谢及神经系统的正常发育方面扮演着重要的角色,且与认知功能密切相关。既往研究证实,甲状腺激素缺乏能损害神经细胞,促进细胞凋亡,使神经系统发育明显滞后,临床以认知、行为、运动等脑的机能障碍为主要特征表现,显微镜下可见大脑及小脑的神经细胞数量减少^[2]。突触融合蛋白 1

(syntaxin-1)是分布于神经细胞突触前膜上的蛋白,有文献指出甲减导致的认知功能障碍可能与海马内的 syntaxin-1 水平失衡有一定相关性^[3]。左甲状腺素替代治疗是对甲减患者的常规干预措施,然而对脑认知功能改善的程度的报道并不一致。大部分研究认为,常规剂量的左甲状腺素替代治疗并不能全恢复 syntaxin-1 水平^[4]。一般大剂量的 T₄ 才能最大程度地恢复脑功能。值得注意的是,近年来,一种可治疗阿尔茨海默病的药物——多奈哌齐,受到众多学者的关注。有研究认为,甲减与阿尔茨海默病发病机制相似:均为脑内乙酰胆碱(Ach)水平下降,多奈哌齐通过增加突触间隙 Ach 水平,减轻甲减患者的认知损伤,或许可以用来作为甲减治疗的辅助药物。基于此,本研究以成年期甲减大鼠模型为研究对象,给予左甲状腺

素和多奈哌齐联合治疗进行干预,同时以常规剂量作为对照,通过检测血清 T3、T4 水平及 syntaxin-1 在各组大鼠前额叶内的蛋白表达情况,探讨左甲状腺素联合多奈哌齐治疗是否可以恢复成年期甲减脑损伤及可能机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 健康雄性 SD 大鼠 60 只,体质量(245±30)g,购自上海市动物疫病预防控制中心。动物证号:SYXK(沪)2015-0013。

1.2 主要仪器与试剂 病理切片机购自湖北泰康医疗设备有限公司;光学显微镜(蔡司 LSM 510z)购自上海信裕生物科技有限公司;电子天平购自德国赛多利斯公司;放射免疫 γ 计数器(GC-300 型)购自安徽中科中佳科学仪器有限公司;形态学图像分析软件(JD-801)购自江苏捷达科技发展有限公司。丙基硫氧嘧啶(PTU)购自上海博研生物科技有限公司;左旋甲状腺素(LT4)购自天津赫索制药有限公司;多奈哌齐片购自重庆植恩药业有限公司;4%多聚甲醛购自北京索莱宝科技有限公司;水合氯醛购自北京索莱宝科技有限公司;T3、T4 放射免疫试剂盒购自北京原子高科核技术应用股份有限公司;兔抗 syntaxin-1 蛋白多克隆抗体购自 Sigma 公司;生物素标记兔抗小鼠 IgG S-P 超敏试剂盒购自上海樊克生物科技有限公司;DAB 染色试剂盒购自北京赛驰生物科技有限公司。EPS-300 电泳仪、VE-186 转膜电槽购自北京原平皓生物技术有限公司。Morris 水迷宫系统购自上海欣软信息科技有限公司。

1.3 方 法

1.3.1 模型制备及分组和干预方式 所有实验动物适应性喂养 3 d 后。把符合实验条件的 SD 大鼠按随机数字表分为 4 组,给予不同干预方式。正常对照组(A 组):常规喂养,灌服等体积的生理盐水。甲减组(B 组):每日腹腔注射丙硫氧嘧啶(PTU)1 mg/100 g,持续 6 周,建立成年期甲减大鼠模型。LT4 替代组(C 组):4 周后每日腹腔注射 LT4(6 μ g/100 g)2 周;LT4 联合多奈哌齐(D 组):4 周后每日腹腔注射 LT4(6 μ g/100 g),再继续喂养 2 周,同时在大黄每日饮用水中加入 0.005%多奈哌齐。

1.3.2 行为学检测 药物干预 2 周后对所有实验对象大鼠行 Morris 水迷宫行为学测试,考查大鼠认知及记忆能力。尽量保持室内光线一致,并保证迷宫附近物品及空间线索不改变。重点观察大鼠 Morris 水迷宫逃避潜伏期、游泳路程、游泳速度的变化。

1.3.3 标本制备

1.3.3.1 血清制备 在进行行为学检测后,于次日晨 9:00—11:00 完成大鼠的采血工作。给予 7%水合氯醛(350 mg/kg)腹腔注射,待麻醉生效后暴露胸腔,采集腹主动脉血(每只 1.5 mL),高速离心后,取上清液存放于-20℃冰箱保存备测。

1.3.3.2 脑标本制备 取血结束后将所有实验动物断头处死,迅速于冰上剥离脑组织,右脑置于 4%的多聚甲醛溶液中固定 1 周,行常规石蜡包埋,连续冠状切片,片厚 6 μ m,每只大鼠取 5 个包含前额叶的切片,置于 4℃冰箱保存待做免疫组织化学检测。左脑分离出海马组织后存放于-80℃冰箱保存用于免疫印迹试验(Western blot)。

1.3.3.3 放射免疫法测定血清甲 T3、T4 水平 T3、T4 水平的检测采用放射免疫法,测仪器为 GC-300 型放射免疫 γ 计数器,具体操作严格按照试剂盒说明书进行。质控范围见表 1。

1.3.4 采用超敏 SP 法行免疫组化检测 组织切片行 SP 法行免疫组化染色,以棕黄色为判定为阳性染色。在 200 倍视

野下拍摄前额叶的各层(分子层、外颗粒层、外锥体细胞层、内颗粒层、内锥体细胞层)。再采用双盲法用生物图像分析系统进行定量分析,计算平均吸光度值(A)。

表 1 T3 和 T4 质控范围(mmol/L)

项目	低质控范围	高质控范围
T3	0.590~0.980	3.230~5.380
T4	23.300~38.800	110.700~184.500

1.3.5 Western blot 采集大鼠海马背侧组织置于匀浆器中,加裂解液冰上匀浆,离心,提取突触小体后,以 BCA 法行蛋白定量分析。蛋白变性、电泳、转膜(电流为 300 mA,转膜时间为 60 min),封闭。接下来用抗 syntaxin-1 多克隆抗体,1:2 500 室温孵育 2 h。立即加入浓度为 1:160 000 的兔抗山羊 IgG 室温孵育 1.5 h,弃二抗,PBS 洗膜,在 X 线片暗盒内曝光,再用显影液显影。通过 syntaxin-1 与内参 GAPDH 的条带 A 值的比值来代表目标蛋白的水平。

1.4 统计学处理 实验数据以 SPSS19.0 统计分析软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间均数的比较采用单向方差分析,两两比较采用 LSD 检验法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 观察大鼠 Morris 水迷宫逃避潜伏期、游泳路程、游泳速度的变化 与 A 组相比,B 组大鼠的逃避潜伏期和游泳路程明显延长($P<0.05$),游泳速度明显变慢($P<0.05$);与 B 组相比,C、D 组的逃避潜伏期和游泳路程明显缩短,游泳速度明显增快($P<0.05$),C、D 两组间比较无明显差异,与 A 组相比差异也无统计学意义,见表 2。

表 2 大鼠 Morris 水迷宫逃避潜伏期、游泳路程、游泳速度变化($\bar{x}\pm s$)

组别	n	逃避潜伏期(s)	游泳路程(cm)	游泳速度(cm/s)
A 组	15	6.13±4.12	405.40±34.56	62.59±4.54
B 组	15	72.32±11.16 ^a	3 245.00±182.32 ^a	40.32±8.65 ^a
C 组	15	9.12±3.24 ^b	456.23±50.32 ^b	58.31±11.56 ^b
D 组	15	7.12±3.18	479.17±34.18	60.16±10.23

^a: $P<0.05$,与 A 组比较;^b: $P<0.05$,与 B 组比较

2.2 观察大鼠血清 T3、T4 水平的变化 与 A 组相比,B 组的 T3、T4 水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 B 组相比,C、D 组的 T3、T4 水平明显升高($P<0.05$),D 组比 C 组升高更加明显($P<0.05$),见表 3。

表 3 大鼠血清 T3、T4 水平浓度的变化(nmol/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	T3	T4
A 组	15	0.65±0.02	55.81±1.41
B 组	15	0.34±0.03 ^a	43.01±1.52 ^a
C 组	15	0.63±0.03 ^b	55.23±1.56 ^b
D 组	15	1.13±0.18 ^{abc}	98.42±0.12 ^{abc}

^a: $P<0.05$,与 A 组比较;^b: $P<0.05$,与 B 组比较;^c: $P<0.05$,与 C 组比较

2.3 免疫组化检测 syntaxin-1 广泛分布于前额叶皮质的神经细胞膜,见图 1。A 组:I 层可见棕褐色颗粒密集和 II 层均可见棕黄色颗粒状致密排列;III 层分为深、浅两层,呈疏松

排列的棕褐色锥体细胞及少量星形细胞;IV层可见大量排列紧密的棕褐色星形细胞和微量锥体细胞;V层大量棕黄色大锥体细胞和少量小星形细胞组成。B组:细胞的排列和分布于A组相似相似,但密度比A组小。对A组和B组大鼠额叶 syntaxin-1 的表达情况进行量化分析后发现:与A组比较,B组大鼠前额叶皮质 I、II、III、IV、V 层 syntaxin-1 免疫反应产物 A 值显著降低 ($P < 0.05$),见表 4。syntaxin-1 免疫反应产物在各组大鼠前额叶皮质 III 层的表达见图 2, syntaxin-1 在各自大鼠前额叶各层的 A 值比较见表 5。

2.4 Western blot 法检测各组大鼠海马 syntaxin-1 表达变化 A、B、C、D 组大鼠海马内 syntaxin-1 表达水平分别为 0.527 ± 0.098 、 0.267 ± 0.085 、 0.578 ± 0.092 、 0.628 ± 0.087 。B 组 syntaxin-1 水平低于对照组,差异有统计学意义 ($P <$

0.05);C、D 组 syntaxin-1 水平比 B 组明显升高 ($P < 0.05$),与 A 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。D 组 syntaxin-1 水平比 C 组高,但差异无统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3。

表 4 A、B 组大鼠前额叶皮质内 syntaxin-1 的 A 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

皮质层	n	A 组	B 组
I 层	15	0.86 ± 0.03	0.16 ± 0.05^a
II 层	15	0.83 ± 0.03	0.15 ± 0.04^a
III 层	15	0.78 ± 0.03	0.12 ± 0.03^a
IV 层	15	0.61 ± 0.02	0.13 ± 0.04^a
V 层	15	0.71 ± 0.02	0.14 ± 0.03^a

^a: $P < 0.05$, 与 A 组比较

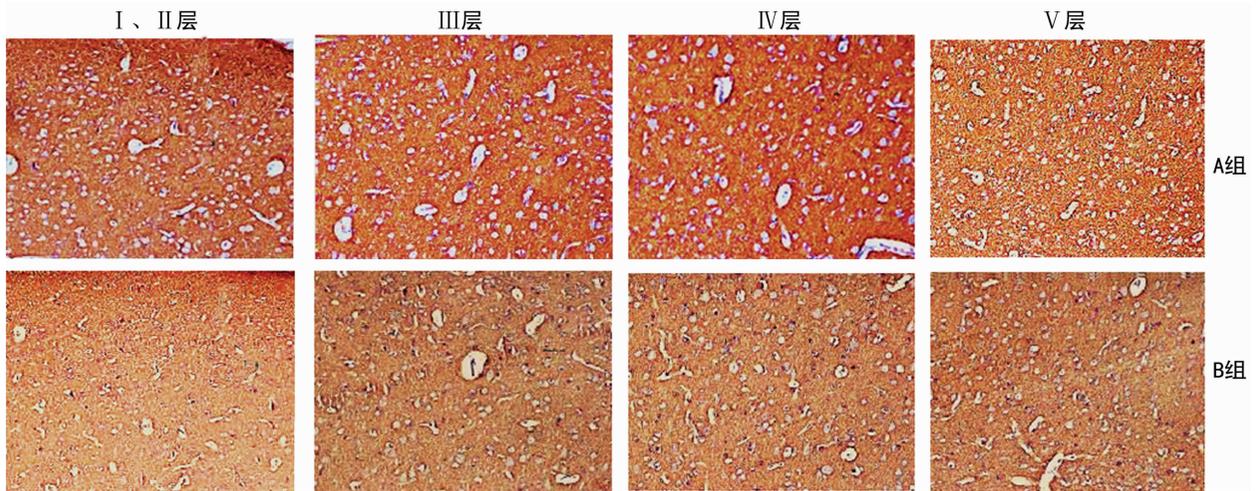


图 1 syntaxin-1 在 A 组和 B 组大鼠前额叶 I、II、III、V 层的表达情况的典型图片 (SP×200)

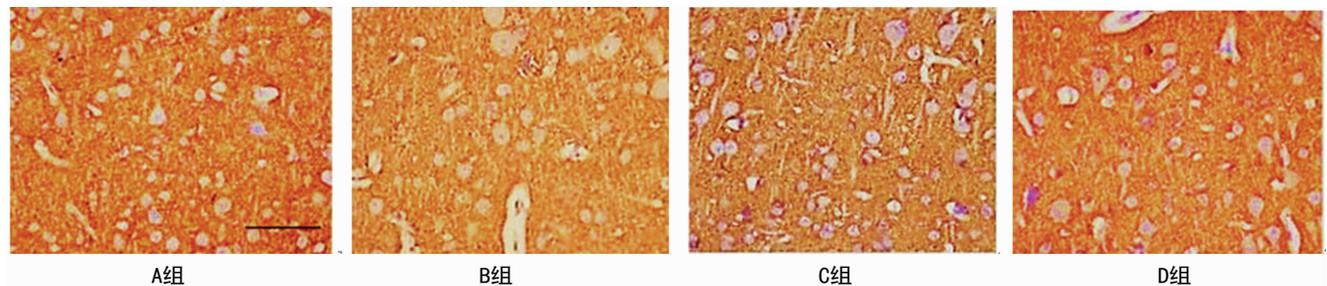


图 2 syntaxin-1 免疫反应产物在各组大鼠前额叶皮质 III 层的表达 (SP×200)

表 5 syntaxin-1 在各自大鼠前额叶各层的 A 值比较 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	I 层	II 层	III 层	IV 层	V 层
A 组	13.35 ± 1.17	11.23 ± 0.87	10.24 ± 0.78	10.89 ± 0.78	11.76 ± 0.86
B 组	8.68 ± 0.57^a	7.57 ± 0.39^a	7.57 ± 0.67^a	6.87 ± 0.36^a	7.24 ± 0.54^a
C 组	10.95 ± 0.89^b	10.71 ± 0.87^b	9.34 ± 1.18^b	9.37 ± 0.59^b	9.89 ± 1.22^b
D 组	11.87 ± 1.76^b	11.12 ± 0.83^b	9.89 ± 1.09^b	10.37 ± 0.64^b	10.89 ± 0.79^b

^a: $P < 0.05$, 与 A 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 B 组比较

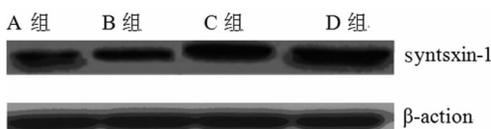


图 3 各组大鼠海马内 syntaxin-1 表达水平

3 讨论

甲减是血清 T3、T4 水平下降的一种常见的内分泌疾病,各个年龄段均可发病^[5]。既往研究证实,甲状腺激素缺乏可导致新生大脑发生不可逆的损伤。即使及时补充了甲状腺激素,儿童期语言能力、智商得分也低于正常孩子,上述现象表明甲状腺激素与神经系统的发育相关^[6]。

研究表明,甲状腺激素调节大脑末端分化过程。甲减状态下大脑发生明显的变化,如大脑皮质和小脑浦肯野细胞的神经纤维的发育迟缓,数量减少^[7]。成年甲减能导致不同程度认知功能及相关脑区的损害,此种损害通过给予左旋甲状腺素(LT4)进行替代治疗能得到一定程度的修复。至于甲减患者的认知功能是否能够完全恢复存在争议,甚至有观点质疑左旋甲状腺素常规剂量替代治疗甲减的效果,因此亟待挖掘治疗甲减的新药,为甲减的治疗提供新的思路。

在制备甲减模型的实验动物中,大鼠应用最多^[8-11]。因为大鼠的甲状腺机能与脑部发育过程与人类的相似度最高,可模拟和重现人类甲减的自然病程,只不过造模所需时间更长,一般需要 4~6 周。本研究选择 SD 雄性大为造模对象,是为排除雌激素对甲状腺激素合成和分泌的影响,而且造模周期符合传统造模周期。另外,在诱导甲减模型的化学药物中,丙硫氧嘧啶(PTU)化学诱导法应用频率最高其通过抑制甲状腺激素的合成的关键酶过氧化物酶来发挥作用的^[9]。PTU 的给药途径可以是口服或注射,本研究对 SD 雄性大鼠采取持续腹腔注射 PTU(1 mg/100 g)6 周的方法进行造模,从表 3 可以看出,B 组大鼠的 T3、T4 水平明显低于 A 组,该结果提示大鼠甲减模型制备成功。

目前,在行为神经科学研究中,啮齿类动物的学习与记忆能力的评估常选用是国际通用的水迷宫实验^[12]。本研究采用水迷宫实验对各组大鼠的认知功能进行评估,结果发现,与 A 组相比,B 组大鼠的逃避潜伏期和游泳路程明显延长、游泳速度明显变慢。结果表明 B 组的学习和记忆能力呈下降趋势。经过药物干预后 C、D 组的逃避潜伏期和游泳路程明显缩短,游泳速度明显增快,可见,如大部分报道所示,LT4 具有改善脑功能,提高记忆能力的作用。本研究结果显示,联合组治疗组效果更明显,分析原因而且可能与单纯使用 LT4 比较,多奈哌齐的加入能够更有效地恢复树突棘数量增加 TRs 的结合率,从而发挥更大的生理效应。

值得注意的是,为从分子水平对 LT4 的治疗甲减的可能机制进行探讨,本研究以大鼠海马突触小体内 syntaxin-1 蛋白为切入点。syntaxin-1 蛋白在中枢神经系统神经递质释放过程中起到重要的调节作用^[13]。研究显示甲减大鼠不同的组织部位 syntaxin-1 表达水平不太统一,究其原因可能与不同组织对甲状腺激素缺乏的反应性有差异有关^[14]。本研究结果显示,与正常对照组比较,甲减组大鼠前额叶皮质 I、II、III、IV、V 层 syntaxin-1 的表达是明显降低的,与该组 T3、T4 水平下降是一致的。经过 LT4 和 LT4 联合多奈哌齐治疗后 syntaxin-1 表达恢复至对照组水平,与此对应的血清 LT4 和 LT3 也恢复至对照组水平。且记忆和学习能力等行为学指标也有改善。该结果提示:甲状腺激素和多奈哌齐对 syntaxin-1 蛋白表达呈正性调节,甲状腺激素替代治疗使其恢复行为学的异常。然而,与单纯甲状腺激素替代治疗相比,LT4 联合多奈哌齐治疗后 syntaxin-1 蛋白表达有恢复得更理想的趋势,其光密度绝对值更接近正常对照组。分析原因可能与多奈哌齐的加入有关。多奈哌齐是第二代胆碱酯酶(AChE)抑制剂,通过抑制胆碱酯酶的活性减少 ACh 的水解,从而升高 ACh 水平。临床上常用来治疗阿尔茨海默病,该病的特点就是记忆的进行性衰退,是一种中枢退行性疾病,研究显示,多奈哌齐可延缓阿尔茨海默病中海马的萎缩进程,起保护神经的作用。有学者也尝试单独用多奈哌齐治疗甲减动物获得成功,然而,具体机制尚不明确。有学者指出与抑制 AChE 有关,但有些学者提出相反意见,因

为其他一些具有抑制中枢 AChE 的药物如新斯的明并不能起到保护神经的作用。有的学者认为多奈哌齐可能通过激活海马内神经营养素受体发挥神经保护作用^[15]。

综上所述,成年期甲减大鼠的学习和记忆能力是下降的,与海马内 syntaxin-1 表达水平减少有关,而甲状腺素可以在一定程度上改善甲减大鼠的行为学指标,与上调 syntaxin-1 表达水平有关,尤以甲状腺素联合多奈哌齐为甚。然而,由于检测指标的局限,尤以甲状腺素联合多奈哌齐是怎么保护神经的?究竟多大的联合剂量才是保护神经的最佳剂量?本研究尚未探明,需设计更加周密而详尽的方案继续深入研究。

参考文献

- [1] Cortinhas Alves EA, Andrade RC, de Melo Amaral CE, et al. Evaluation of the tshr gene reveals polymorphisms associated with typical symptoms in primary congenital hypothyroidism[J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2016, 29(1):71-76.
- [2] Khan A, Harney JW, Zavacki AM, et al. Disrupted brain thyroid hormone homeostasis and altered thyroid hormone-dependent brain gene expression in autism spectrum disorders[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2014, 65(2):257-272.
- [3] 李保山,查小雪,朱德发,等. 甲状腺素联合多奈哌齐对成年期甲状腺功能减退症大鼠海马 syntaxin-1 的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(10):1390-1393.
- [4] 郑燕,宁丹,朱洋波,等. 甲状腺素对甲状腺功能减退症大鼠海马 syntaxin-1 蛋白表达的影响[J]. *中华地方病学杂志*, 2012, 31(2):162-166.
- [5] Sánchez-Huerta K, Pacheco-Rosado J, Gilbert ME. Adult onset-hypothyroidism; alterations in hippocampal field potentials in the dentate gyrus are largely associated with anaesthesia-induced hypothermia[J]. *J Neuroendocrinol*, 2015, 27(1):8-19.
- [6] Willoughby KA, McAndrews MP, Rovet JF. Effects of maternal hypothyroidism on offspring hippocampus and memory[J]. *Thyroid*, 2014, 24(3):576-584.
- [7] Singh S, Trivedi R, Singh K, et al. Diffusion tensor tractography in hypothyroidism and its correlation with memory function[J]. *J Neuroendocrinol*, 2014, 26(11):825-833.
- [8] Wang Y, Wang Y, Dong J, et al. Developmental hypothyroxinaemia and hypothyroidism limit dendritic growth of cerebellar Purkinje cells in rat offspring; involvement of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and stathmin[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2014, 40(4):398-415.
- [9] Akmal A, Kung J. Propylthiouracil, and methimazole, and carbimazole-related hepatotoxicity[J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2014, 13(10):1-10.
- [10] 吴鹏飞,周细华. 甲状腺切除术甲状腺功能减退症替代治疗的研究[J]. *实用药物与临床*, 2015, 18(11):1329-1331.
- [11] Beydoun MA, Beydoun HA, Rostant OS, et al. Thyroid hormones are associated with longitudinal cognitive change in an urban adult population[J]. *Neurobiol Aging*, 2015, 36(11):3056-3066. (下转第 4491 页)

生足部溃疡高危因素的足,但无溃疡。目前我国的 DF 临床工作主要集中在重症 DF 的治疗中,但 DF 一旦出现溃疡,即使经过积极有效的治疗,效果也不理想。因此,DF 的治疗应防重于治。以预防溃疡发生的 0 级 DF 的治疗开始。

DF 属传统中医的“消渴脱疽”范畴,其病机主要是消渴病日久,导致气血阴阳俱损,气虚鼓动无力,血虚无以充盈血脉,导致血脉淤滞,日久损伤阳气,不能温煦,出现四肢皮肤暗淡,疼痛,麻木,皮温下降等表现。故治当以益气滋阴养血,温阳祛瘀通脉为主要治则。本院协定处方通络愈足 I 号方是在此治疗基础上结合多为名老中医治疗 DF 的临床经验拟定而成,方中黄芪补气温阳,党参补中益气生津,以滋气血生化之源,共为方中君药;生地、当归、赤芍生津活血,丹参活血化瘀,川芎行气活血,为血中之气药,气行则血行,玄参、知母养阴生津降火,共为臣药;葛根生津止渴、去瘀生新,桂枝温阳,路路通、地龙祛风化瘀通络,为佐使药,诸药合用,即补气滋阴养血治其本,又兼活血化瘀、温阳通脉治其标,达到标本同治。现代药理研究显示,方中黄芪、生地、葛根、丹参、知母及党参等药均具有良好的降血糖作用。本研究表明,观察组临床症状改善情况显著优于对照组,临床总有效率高于对照组,提示通络愈足 I 号方治疗 0 级 DF 临床疗效确切,可显著改善患者临床症状。

结果还显示,观察组患者的踝臂指数和神经传导功能改善程度均显著优于对照组,提示本方有利于提高下肢的肌肉活力和神经的敏感性,改善 DF 患者神经传导功能。同时,观察组在改善血流动力学和控制血脂方面均显著优于对照组,说明本方可改善 DF 患者肢体血流状态和血管舒缩状态,降低血液黏度,从而改善患肢的血液循环,提高局部血供,延缓局部动脉粥样硬化进展,改善其缺血状态。

DF 的发病机制较为复杂,在其发病过程中,多种细胞因子参与并促进了 DF 的发生发展。TNF- α 是参与机体炎症反应过程的常见细胞因子,在机体的抗肿瘤、感染和促进组织修复中均发挥重要作用。研究发现,DF 患者体内 TNF- α 水平可显著升高,其可能参与了糖尿病下肢血管病变的发生发展,同时还可能与胰岛素抵抗、血管内皮功能损伤,血管粥样硬化等多个病理过程有关^[7]。AT-III 是人体重要的抗凝因子,研究发现,DF 患者血管内皮功能受损可直接激活内外凝血途径,导致 AT-III 被大量消耗并生成障碍^[8-9],因此,检测 AT-III 水平可反映 DF 患者体内的血凝状态。同时 VEGF 是机体重要的促血管内皮生长的因子。据报道,动脉粥样斑块形成时伴随着 VEGF 的显著升高,其可能参与了管腔内皮的修复,但同时也会导致血管通透性的增加,引起炎症细胞和脂蛋白更容易进入血管内皮下,进一步加重了动脉粥样硬化进程并形成恶性循

环^[10]。本研究结果显示,治疗后观察组血清 TNF- α 及 VEGF 水平显著下降,而 AT-III 水平升高,且改善程度优于对照组,提示通络愈足 I 号方可降低 DF 患者机体的炎症因子水平和高凝状态,改善内皮系统功能,从而促进 DF 的愈合。

综上所述,通络愈足 I 号方对 DF 具有良好的临床疗效,可显著改善 DF 患者肢体的缺血状态和神经传导功能,其机制可能与改善血液的高黏状态和微循环,降低机体炎症因子水平,减轻末梢神经损伤,修复内皮细胞功能有关。

参考文献

- [1] 费扬帆,王椿,陈大伟,等.住院糖尿病足患者截肢率与截肢危险因素分析[J].中华医学杂志,2012,92(24):1686-1689.
- [2] 翁霞玲,李志浩,黄翠英,等.2 型糖尿病患者糖尿病足相关危险因素分析[J].护士进修杂志,2014,29(6):522-525.
- [3] 郑筱萸.中药新药临床研究指导原则:试行[M].北京:中国医药科技出版社,2002:127-233.
- [4] 蔡媛媛,梁海琳,俞洁.老年糖尿病患者糖尿病足的相关危险因素分析及护理[J].护士进修杂志,2016,31(2):155-157.
- [5] 张洪,张文广,蔡文智,等.糖尿病足感染病原菌分布、药敏及 Silverloy 抗菌效果[J].广东医学,2015,36(16):2520-2522.
- [6] 洗呈,赵劲民,苏伟,等.外固定架骨搬移系统修复糖尿病足:功能与影像学评价[J].中国组织工程研究,2015,19(46):7539-7544.
- [7] 徐松明,许晓华,孙云鹰,等.硫辛酸对早期糖尿病足患者氧化应激与炎症反应的影响[J].中国临床药理学杂志,2015,31(11):909-911,915.
- [8] 邵晶莹,黄立娟,杜桂芹,等.糖尿病慢性并发症凝血功能变化的临床意义[J].中国实验诊断学,2014,18(6):956-958.
- [9] 熊微,熊亮,张静,等.糖尿病足患者血浆 D-二聚体、纤维蛋白原水平及抗凝血酶 III 活性[J].微循环学杂志,2013,23(2):26-27.
- [10] 付汉东,张爱华,鲁艳,等.自体骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足患者血管内皮生长因子的表达及意义[J].中国全科医学,2010,13(23):2554-2556.

(收稿日期:2017-04-11 修回日期:2017-07-22)

(上接第 4487 页)

- [12] Li K, Liu JW, Zhu ZC, et al. DSTYK kinase domain ablation impaired the mice capabilities of learning and memory in water maze test[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(10): 6486-6492.
- [13] Kofuji T, Fujiwara T, Sanada M, et al. HPC-1/syntaxin 1A and syntaxin 1B play distinct roles in neuronal survival[J]. J Neurochem, 2014, 130(4): 514-525.
- [14] Vardar G, Chang S, Arancillo M, et al. Distinct functions

of syntaxin-1 in neuronal maintenance, synaptic vesicle docking, and fusion in mouse neurons[J]. J Neurosci, 2016, 36(30): 7911-7924.

- [15] Rodrigues Simões MC, Dias Viegas FP, Moreira MS, et al. Donepezil: an important prototype to the design of new drug candidates for Alzheimer's disease[J]. Mini Rev Med Chem, 2014, 14(1): 2-19.

(收稿日期:2017-04-12 修回日期:2017-06-13)