

• 药理与临床 •

干姜干热药性活性分子的筛选与抗小鼠低温冻伤的甲状腺氧化应激保护作用机制

苗艳丰¹, 卫贺¹, 李诚², 张静¹, 李照雪³, 王晓琴², 张波^{1,2*}

1. 石河子大学药学院 新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆 石河子 832002

2. 成都大学药学院 四川抗菌素工业研究所, 四川 成都 610106

3. 石河子大学附属第一医院, 新疆 石河子 832002

摘要: **目的** 探讨干姜干热药性的药理特点及对低温冻伤的保护作用。**方法** 以甲状腺功能评价为研究内容, 建立低温冻伤小鼠模型(-20 ± 1) °C, 通过形态学与分子生物学等手段评价干姜醇提物对小鼠低温冻伤的保护作用, 通过系统药理学方法筛选出活性成分与关键靶标。建立体外人甲状腺乳头状癌 BCPAP 细胞氧化损伤模型并评价相关活性分子的保护作用。**结果** 系统药理方法筛选出姜黄素等代表性成药分子, 预测靶标富集在甲状腺激素信号通路、FoxO 通路等 5 条信号通路。干姜醇提物显著延长低温冻伤小鼠的生存时间, 升高血清中游离三碘甲状腺原氨酸(free triiodothyronine, FT3)和游离甲状腺素(free thyroxine, FT4)水平($P < 0.05, 0.01$), 上调小鼠甲状腺功能相关基因钠/碘协同转运蛋白(sodium/iodide cotransporter, Nis)、甲状腺过氧化物酶(thyroid peroxidase, Tpo)、甲状腺球蛋白(thyroglobulin, Tg) mRNA 表达水平($P < 0.01$), 下调促甲状腺素受体(thyroid stimulating hormone receptor, Tshr) mRNA 表达水平($P < 0.01$), 改善低温导致的甲状腺滤泡破损。体外实验发现干姜代表成分姜黄素、6-姜酚对 H₂O₂ 诱导的 BCPAP 细胞损伤有显著保护作用($P < 0.05, 0.01$)。**结论** 干姜及其活性成分姜黄素、6-姜酚能够通过抗甲状腺氧化应激、促甲状腺功能从而保护小鼠低温冻伤。

关键词: 干姜; 抗冻; 干热; 温里; 甲状腺; 系统药理学; 姜黄素; 6-姜酚

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)17-5379-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.17.014

Active molecules screening of dry-heat-related *Zingiberis Rhizoma* and protective mechanism against thyroid oxidative stress induced by low-temperature frostbite in mice

MIAO Yan-feng¹, WEI He¹, LI Cheng², ZHANG Jing¹, LI Zhao-xue³, WANG Xiao-qin², ZHANG Bo^{1,2}

1. Xinjiang Key Laboratory of Plant Medicine Resource Utilization, Ministry of Education, School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China

2. Sichuan Antimicrobial Industry Research Institute, School of Pharmacy, Chengdu University, Chengdu 610106, China

3. The First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi 832002, China

Abstract: Objective To explore the pharmacological characteristics of dry heat properties of Ganjiang (*Zingiberis Rhizoma*) and its protective effect on low temperature frostbite. **Methods** Taking the evaluation of thyroid function as the research content, a low-temperature frostbite mouse model (-20 ± 1) °C was established, and protective effect of *Zingiberis Rhizoma* alcohol extract on low-temperature frostbite in mice was evaluated by means of morphology and molecular biology. The active ingredients and key targets were screened out by chemical methods. An *in vitro* human papillary thyroid carcinoma BCPAP cell model of oxidative damage was established to evaluate the protective effect of related active molecules. **Results** The representative drug molecules such as curcumin were screened out by systematic pharmacological method, and predicted targets were enriched in five signaling pathways including thyroid hormone signaling pathway and FoxO pathway. *Zingiberis Rhizoma* alcohol extract significantly prolonged the survival time

收稿日期: 2022-03-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(U1603122); 新疆生产建设兵团创新领域中青年领军人才项目(2018CB019)

作者简介: 苗艳丰(1996—), 女, 硕士, 研究方向为中药药理学。Tel: 18699597678 E-mail: 2689607902@qq.com

*通信作者: 张波(1978—), 男, 研究生导师, 教授, 从事系统药理学与中药药理学研究。Tel: (0993) 2057670 E-mail: bozhang_lzu@126.com

of low-temperature frostbite mice, increased levels of free triiodothyronine (FT3) and free thyroxine (FT4) in serum ($P < 0.05, 0.01$), up-regulated thyroid function-related genes sodium/iodide cotransporter (*Nis*), thyroid peroxidase (*Tpo*), and thyroglobulin (*Tg*) mRNA expression levels in mice ($P < 0.01$), down-regulated thyroid stimulating hormone receptor (*Tshr*) mRNA expression level ($P < 0.01$), improved the damage of thyroid follicles caused by hypothermia. *In vitro* experiments found that curcumin and 6-gingerol, the representative components of *Zingiberis Rhizoma*, had significant protective effects on H_2O_2 -induced BCPAP cell injury ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** *Zingiberis Rhizoma* and its active components, curcumin and 6-gingerol, can protect mice from low temperature frostbite by resisting thyroid oxidative stress and promoting thyroid function.

Key words: *Zingiberis Rhizoma*; antifreeze; dry heat; warming; thyroid; system pharmacology; curcumin; 6-gingerol

低温是一种新疆冬季常见的环境因素，长期低温暴露会对户外作业者的身体造成严重损害。通过药物提高机体的抗寒冷应激能力是目前抗寒冷应激研究的热点。干姜味辛，性热，在民族医药与饮食文化中有悠久的历史。维吾尔医学著作《注医典》《白色宫殿》记录干姜药性三级末热、二级干，温胃，温肝，燥胃中余湿；《拜地依药书》记载干姜具有开通湿寒性肝脏阻塞作用。提示干姜具有活血化瘀、温中散寒、回阳通脉等功效。甲状腺是机体维持体温和产热的重要脏器，机体对低温代偿会产生甲状腺激素及诱导甲状腺氧化应激^[1]。干姜作为常见的药食同源中药，因其成分复杂、用途广泛，尚不明确其干热药性对应何种机制^[2]。本课题组前期研究发现姜黄素通过保护甲状腺来延长小鼠低温生存时间^[3]，但仍无法确认干姜干热药性关键成分与机制，而 6-姜酚作为干姜的质量标志物是干姜中含量最高的姜辣素成分^[4]，需进一步明确多组分药理作用。本研究通过干姜的系统药理学机制研究与温中散寒的药效学研究，揭示干姜“温里”功效的系统网络药理学分子机制，筛选出干姜干热药性代表成分，预测靶标，并验证其低温保护机制。

1 材料

1.1 动物

清洁级昆明雄性小鼠，6~7 周龄，体质量 18~22 g，购自新疆维吾尔自治区动物研究中心，动物许可证号 SCXK（新）2016-0003。动物饲养于温度（23±2）℃、湿度 40%~60%的环境中，自由进食饮水。动物实验经石河子大学医学院第一附属医院实验动物伦理委员会批准（批准号 A2022-085-01）。

1.2 细胞

人甲状腺癌乳头状 BCPAP 细胞购自中科院上海细胞所。

1.3 药品与试剂

干姜（批号 190801-X）购自新疆石河子附属医院，经石河子附属医院李照雪主管药师鉴定为姜科

植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥根茎；对照品姜黄素（质量分数≥98%，批号 R08S8S43416）、6-姜酚（质量分数≥98%，批号 P15J11F118583）购自上海源叶生物科技有限公司；丙硫氧嘧啶（propylthiouracil, PTU, 批号 2010N07）购自上海朝晖药业有限公司；左旋甲状腺素钠（LT4, 批号 G00RHH）购自默克雪兰诺有限公司；血清游离三碘甲状腺原氨酸（free triiodothyronine, FT3）ELISA 试剂盒（批号 Aug2021）、游离甲状腺素（free thyroxine, FT4）ELISA 试剂盒（批号 Aug2021）购自上海酶联生物科技有限公司；过氧化氢（hydrogen peroxide, H_2O_2 ）测试盒（批号 20201022）、DCFH-DA 探针（批号 20210915）购自南京建成生物工程研究所；总 RNA 提取试剂盒（批号 H409KA9619）购自上海生工生物工程公司；逆转录试剂盒（批号 01118944）、CMFDA 探针（批号 2263495）购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；实时荧光定量扩增试剂盒（批号 169025387）购自德国 QIAGEN 公司；Hoechst 33258 探针（批号 GA14FA0001）购自 BBI 生命科学有限公司；RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司；胎牛血清（fetal bovine serum, FBS）购自 Biological Industries；MTT（批号 1223G0525）购自索莱宝生物科技有限公司；促甲状腺素受体（thyroid stimulating hormone receptor, *Tshr*）、甲状腺球蛋白（thyroglobulin, *Tg*）、甲状腺过氧化物酶（thyroid peroxidase, *Tpo*）、钠/碘协同转运蛋白（sodium/iodide cotransporter, *Nis*）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Gapdh*）引物由上海生工生物工程公司合成，引物序列见表 1。

1.4 仪器

多功能酶标仪、CO₂ 培养箱（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；低温离心机（德国 Eppendorf 公司）；Rotor-Gene Q 型实时荧光定量 PCR 仪（德国 QIAGEN 公司）；正置荧光显微镜（德国 Zeiss 公司）；1260 型高效液相色谱仪（美国安捷伦公司）；

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	种属	序列 (5'-3')
<i>Tg</i>	小鼠	F: ACTCTGCCCACCCAGAATCAA R: GGGGAAACTGCTCTGATGGC
<i>Tpo</i>	小鼠	F: CACTGGTCTCTGTTTGCATGTATC R: TAGTTCCTGCCTCTGAGCGTCTG
<i>Tshr</i>	小鼠	F: TCATTGCCTCTGTAGAAGCTG R: TGATAACTCACTGGCGAAA
<i>Nis</i>	小鼠	F: GTGGGCCAGTTGCTCAATTC R: GTGCGTAGATCACGATGCCA
<i>Gapdh</i>	小鼠	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG R: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
<i>Tg</i>	人	F: CCAGTGGCTTCTTCTCTGACT R: CCTTGGAGGAAGCGGATGGTTT
<i>Tpo</i>	人	F: ACTGTGTCCAACGTGTTCTTC R: AAGTCCAGGATCTTGTCCGC
<i>Tshr</i>	人	F: CAATGGGACAAAGCTGGATG R: TGACACTGGTTTGACACACG
<i>Nis</i>	人	F: CAGCTTCTATGCCATCTCCTATC R: TCCACCACAACAATCCC
<i>Gapdh</i>	人	F: ACTTTGGTATCGTGAAGGACTCAT R: GTTTTCTAGACGGCAGGTCAGG

旋转蒸发仪 (上海爱朗仪器有限公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 干姜活性成分与靶点的筛选 通过 TCMSP、TCMID 数据库及文献报道收集干姜活性成分, 使用 ADMET 软件筛选出 ADMET_Risk ≤ 7.5、Absn_Risk ≤ 3.5、CYP_Risk ≤ 2.5、TOX_Risk ≤ 2.0 的活性成分作为候选药效成分^[5]。通过 PharmMapper 服务器选择 Z-score 值大的前 15 名的蛋白作为候选靶蛋白^[6]。再使用 SwissTargetPrediction 数据库选择 Probability 值大的前 15 名的蛋白作为候选靶蛋白^[7], 最后结合文献报道进行靶点分析与整理。

2.1.2 活性成分靶点的基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析及网络拓扑学分析 通过 GeneCard 数据库对靶点进行归类, 采用 STRING 数据库和 Cytoscape 软件进行网络构建。通过 OMIM 数据库以 “Cold tolerance” 和 “Cold sensitivity” 为检索词检索出疾病靶点, Venny 2.1 网站得到韦恩图, 并得到 49 个交集靶点作为核心靶点。通过 Metascape 数据库对筛选出来的核心靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。CTD 数据库找到核心靶点所对应的疾病, 建立靶点-疾病通路图。通过 Cytoscape 软件中 MCODE 分析进行核心靶点模块分析。

2.2 体内实验验证

2.2.1 干姜醇提物的制备 取干姜 50 g 粉碎, 过筛, 加入 95%乙醇 400 mL, 避光浸泡 24 h, 超声提取 1 h, 静置 1 h 后, 再超声 1 h, 抽滤, 加入 95%乙醇 400 mL 超声 1 h, 抽滤并合并滤液, 40 °C 减压浓缩, 挥干残留的乙醇, 得到干姜醇提取物^[8]。经 HPLC 检测, 干姜醇提物中 6-姜酚、姜黄素质量分数分别为 19.55%、0.072%^[9-10]。

2.2.2 常温下动物分组及给药 取 12 只小鼠作为对照组, 另设置干姜低、中、高剂量 (25、50、100 mg/kg) 组。各给药组 ig 干姜醇提物, 连续 15 d^[8]。

取 24 只小鼠 ig PTU (220 mg/kg), 1 次/d, 连续 30 d, 制备甲减模型^[3], 随机分为 PTU 组、PTU+干姜组, 每组 12 只, PTU 组 ig 生理盐水, PTU+干姜组 ig 干姜醇提物 (50 mg/kg), 1 次/d, 连续 15 d。

取 24 只小鼠 sc LT4 (0.35 mg/kg), 1 次/d, 连续 14 d, 制备甲亢模型^[3,11], 随机分为 LT4 组、LT4+干姜组, 每组 12 只, LT4 组 ig 生理盐水, LT4+干姜组 ig 干姜醇提物 (50 mg/kg), 1 次/d, 连续 15 d。

每天给药 1 h 后监测各组小鼠的肛温、饮水量及体质量的变化。实验第 15 天, 给药 1 h 后, 对照组和干姜低、中、高剂量组各取 6 只小鼠眼球取血, 分离血清, 按照试剂盒说明书测定血清中 FT3、FT4 水平。

2.2.3 低温冻伤下动物分组及给药 按 “2.2.2” 项下进行分组及给药, 另取 12 只小鼠作为模型组。模型组 ig 生理盐水, 1 次/d, 连续 15 d。实验第 15 天给药 1 h 后, 模型组、干姜各剂量组、PTU 组、PTU+干姜组、LT4 组和 LT4+干姜组各取 6 只小鼠, 进行 (-20 ± 1) °C 低温冻伤 2 h^[3], 眼球取血, 分离血清, 按照试剂盒说明书测定血清中 FT3、FT4 水平。模型组及干姜低、中、高剂量组和 PTU 组、PTU+干姜组、LT4 组、LT4+干姜组各取 6 只小鼠, 持续 (-20 ± 1) °C 低温冻伤直至小鼠休克惊厥, 记录小鼠休克惊厥时间。

2.2.4 小鼠甲状腺组织形态学观察 “2.2.3” 项下小鼠眼眶采血后, 处死小鼠, 取甲状腺组织, 用包埋剂包埋冰冻切片, 进行苏木素-伊红 (HE) 染色, 于光学显微镜下观察甲状腺组织形态学变化。

2.2.5 小鼠血清及甲状腺氧化应激水平测定 H₂O₂ 与钼酸所生成的络合物在 405 nm 处检测其生成量可计算出 H₂O₂ 的量^[12]。使用 H₂O₂ 试剂盒测定 “2.2.3” 项下对照组及模型组小鼠血清及甲状腺中 H₂O₂ 水平。

2.2.6 qRT-PCR检测小鼠甲状腺组织中甲状腺功能相关因子 mRNA 表达 取“2.2.3”项下各组小鼠甲状腺组织,按照试剂盒说明书提取甲状腺组织中总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析^[13]。

2.3 体外实验验证

2.3.1 细胞存活率检测 将对数生长期的 BCPAP 细胞以 8000 个/孔接种于 96 孔板中,每孔 100 μL,待细胞完全贴壁后,随机分为对照组、H₂O₂ 组、姜黄素 (0.5、1、2 μmol/L) 组、6-姜酚 (2.5、5、10 μmol/L)、姜黄素 (0.5 μmol/L) + 6-姜酚 (5 μmol/L) 组、姜黄素 (0.037 μmol/L) + 6-姜酚 (10 μmol/L) 组、抗氧化剂 *N*-乙酰-*L*-半胱氨酸 (*N*-acetyl-*L*-cysteine, NAC, 5 μmol/L) 组和 LT4 (0.015 μmol/L) 组^[14]。各给药组加入相应药物处理 24 h 后,除对照组外,其余各组再加入 50 μmol/L H₂O₂ 处理 24 h; 每孔加入 MTT,采用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度 (*A*) 值。

2.3.2 细胞谷胱甘肽、活性氧含量测定和 Hoechst 33258 染色 采用 CMFDA 探针检测细胞内还原性谷胱甘肽含量 ($E_x/E_m=492\text{ nm}/517\text{ nm}$)^[15], DCFH-DA 探针检测细胞内活性氧含量 ($E_x/E_m=488\text{ nm}/525\text{ nm}$)^[15], Hoechst 33258 探针检测细胞内凋亡情况 ($E_x/E_m=450\text{ nm}/490\text{ nm}$)^[16]。收集“2.3.1”项下各组细胞,加入终浓度为 5 μmol/L 的 CMFDA 探针,37 °C 孵育 30 min; 加入终浓度为 10 μmol/L 的 DCFH-DA 探针,37 °C 孵育 30 min; 加入终质量浓度为 5 μg/mL 的 Hoechst 33258 探针,37 °C 孵育 15 min,用 PBS 洗掉未进入细胞内的荧光探针,于荧光显微镜下观察荧光强度。

2.4 统计学分析

采用 SPSS 20.0、GraphPadPrism 8.0 统计软件进行分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组比较采用方差分析。

3 结果

3.1 干姜活性成分与相关靶点筛选

通过文献和数据库挖掘,共收集到 170 个活性成分。筛选排名前 10 的活性成分,分别为 α-松油

醇、异冰片、*L*-冰片乙酸酯、2-[(2*S*,5*R*)-5-ethenyl-5-methyloxolan-2-yl]propan-2-ol、冰片、4-姜酚、姜黄素、1,8-桉树脑、(*R*)-芳樟醇和 6-姜酚。经数据库预测、合并去掉重复后,共获得干姜潜在作用靶点 148 个。

3.2 靶点分类网络构建与模块分析

活性成分筛选出的 148 个靶点分类后利用 STRING 和 Cytoscape 构建活性成分靶点分类图(图 1),从靶点分类来看这些靶点与神经内分泌、代谢、心血管系统等密切相关。活性成分靶点与疾病靶点取交集,得到 49 个核心靶点(图 2),聚类分析发现模块 1 与模块 2 主要与激素生成、细胞对含氧化合物的反应、糖类脂质代谢相关,模块 3 主要与甲状腺激素生成密切相关,模块 4 与炎症反应密切相关(图 3)。

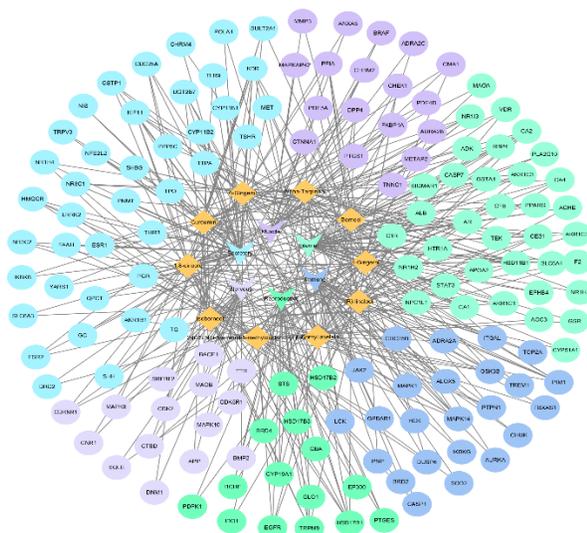


图 1 化合物靶点分类网络图

Fig. 1 Compound target classification network diagram

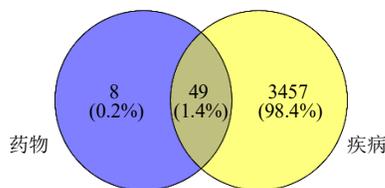


图 2 药物靶点与疾病靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of drug targets and disease targets

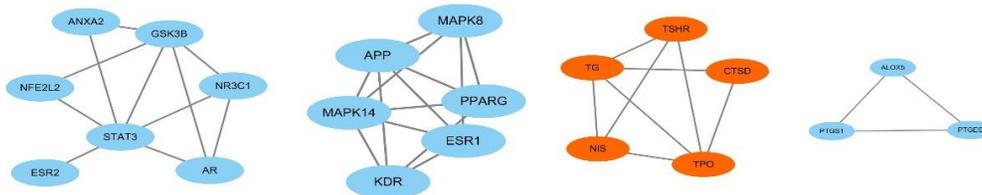


图 3 核心靶点结构聚类分析

Fig. 3 Structural cluster analysis of core targets

3.3 核心靶点 GO 功能、KEGG 通路富集分析及活性成分-靶点-疾病网络分析

如图4所示, GO 功能富集分析发现, 核心靶点与激素代谢过程、炎症反应的调节、活性氧代谢过程、甲状腺激素代谢过程等相关。KEGG 通路富集分析发现, 核心靶点与甲状腺激素信号通路、FoxO 信

号通路等相关。活性成分-靶点-疾病网络见图5, 核心靶点与神经内分泌和心血管系统疾病密切相关。

3.4 干姜对常温下小鼠甲状腺的保护作用

如表2所示, 常温下, 干姜给药15d后各剂量组小鼠饮水量和肛温均较给药前明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。如图6所示, 与对照组比较, 干姜各

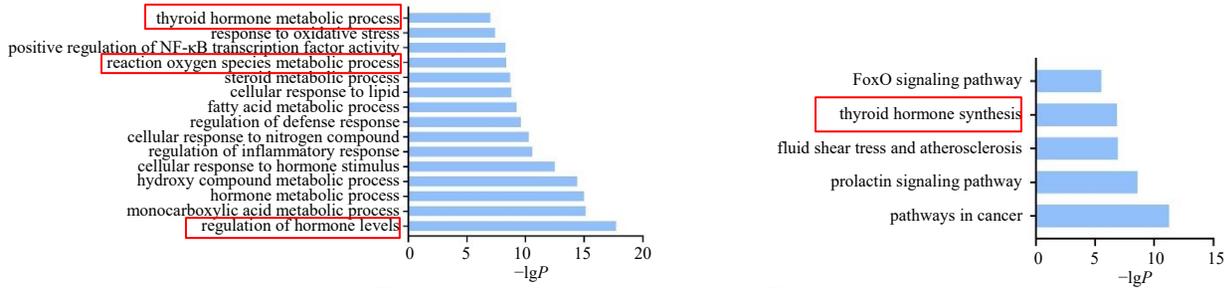


图4 核心靶点的 GO 功能与 KEGG 通路富集分析

Fig. 4 GO function and KEGG pathway enrichment analysis of core targets

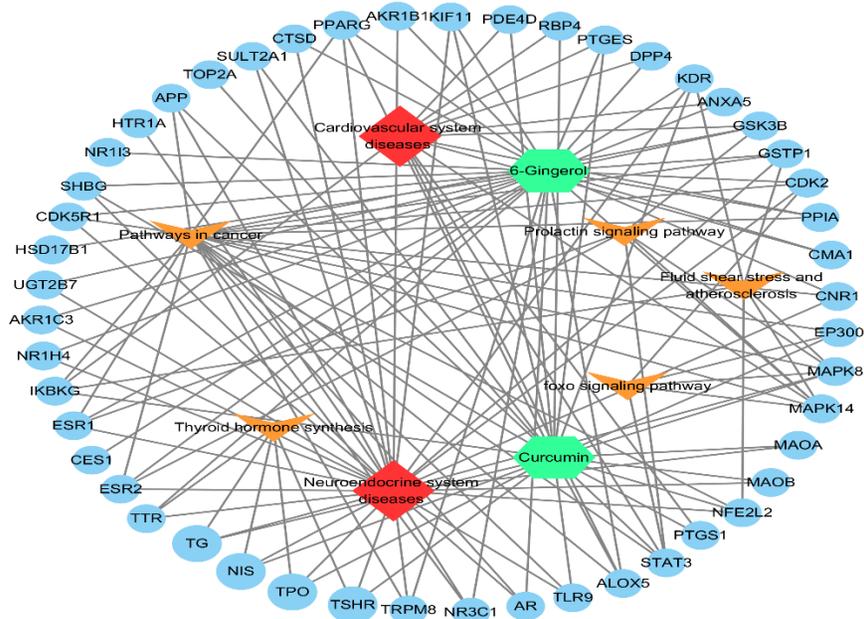


图5 化合物-靶点-疾病网络模式图

Fig. 5 Compound-target-disease network pattern diagram

表2 常温下小鼠基本指标 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Basic indicators of mice at room temperature ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体质量/g		肛温/°C		饮水量/mL	
		给药前	给药后	给药前	给药后	给药前	给药后
对照	—	22.27±2.80	23.00±2.21	37.23±0.95	37.25±0.97	6.38±0.17	5.98±0.12
干姜	25	20.46±1.10	21.11±2.85	37.24±0.85	37.77±0.73**	5.30±0.10	5.97±0.15*
	50	20.34±1.53	20.12±1.82	37.14±0.72	37.81±0.46**	5.13±0.23	6.35±0.22**
	100	22.37±2.07	23.39±2.88	37.83±0.32	38.14±0.31**	5.84±0.14	7.11±0.25**
PTU+干姜	220+50	26.26±2.82	25.94±3.07	37.85±0.37	37.85±0.47	4.93±0.06	3.48±0.07**
PTU	220	25.06±2.43	26.76±2.10*	37.83±0.21	37.80±0.26	5.01±0.18	3.33±0.00**
LT4+干姜	0.35+50	22.93±3.30	22.57±2.20	37.45±0.84	37.43±0.38	4.10±0.07	7.91±0.21**
LT4	0.35	23.66±2.97	22.28±2.01*	37.75±0.21	37.80±0.14	4.19±0.24	8.00±0.33**

与同组给药前比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs same group before administration

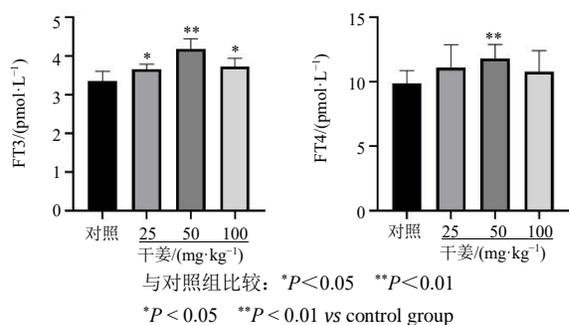


图 6 干姜对常温下小鼠血清中 FT3 和 FT4 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effect of *Zingiberis Rhizoma* on levels of FT3 and FT4 in serum of mice at room temperature ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

剂量组血清中 FT3 水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), 干姜中剂量组血清中 FT4 水平显著升高 ($P < 0.01$)。

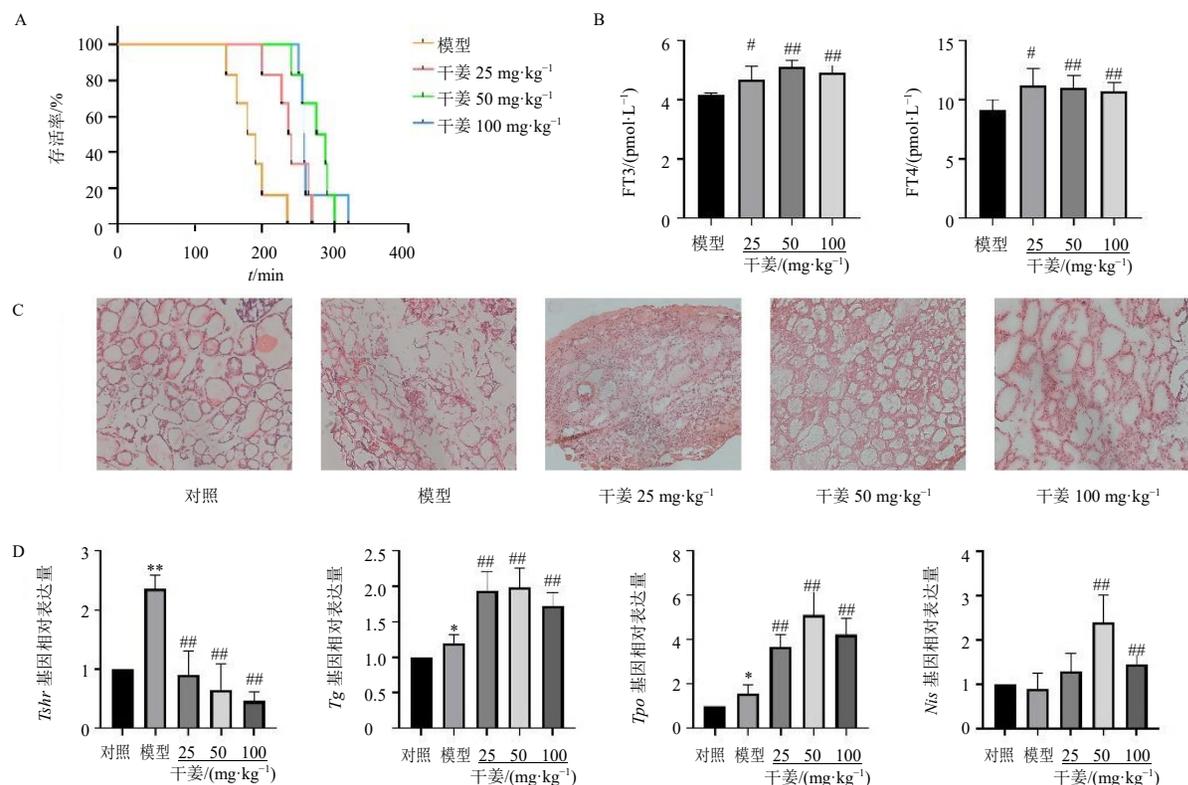
3.5 干姜对低温冻伤小鼠甲状腺的保护作用

如图 7 所示, 小鼠低温冻伤后, 与模型组比较, 干姜各剂量组小鼠的生存时间显著延长, 血清中

FT3、FT4 水平均显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), 甲状腺组织 *Tpo*、*Tg* mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.01$), *Tshr* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 干姜中、高剂量组甲状腺组织 *Nis* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 镜下可见甲状腺腺泡破损减少。

3.6 PTU、LT4 及与干姜联合处理对低温冻伤小鼠甲状腺功能的影响

如表 2 所示, PTU 组小鼠体质量较给药前显著升高 ($P < 0.05$), 饮水量显著减少 ($P < 0.01$); LT4 组体质量较给药前显著降低 ($P < 0.05$), 饮水量显著增加 ($P < 0.01$)。如图 8 所示, 小鼠低温冻伤后, 与模型组比较, PTU 组小鼠生存时间明显缩短, 血清中 FT3、FT4 水平显著降低 ($P < 0.01$), 甲状腺组织中 *Nis*、*Tpo*、*Tg*、*Tshr* mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 甲状腺滤泡大部分破碎, 腔内胶质减少; 经干姜治疗后情况均改善。与模型组比较, LT4 组小鼠生存时间显著延长, 血清中 FT3、

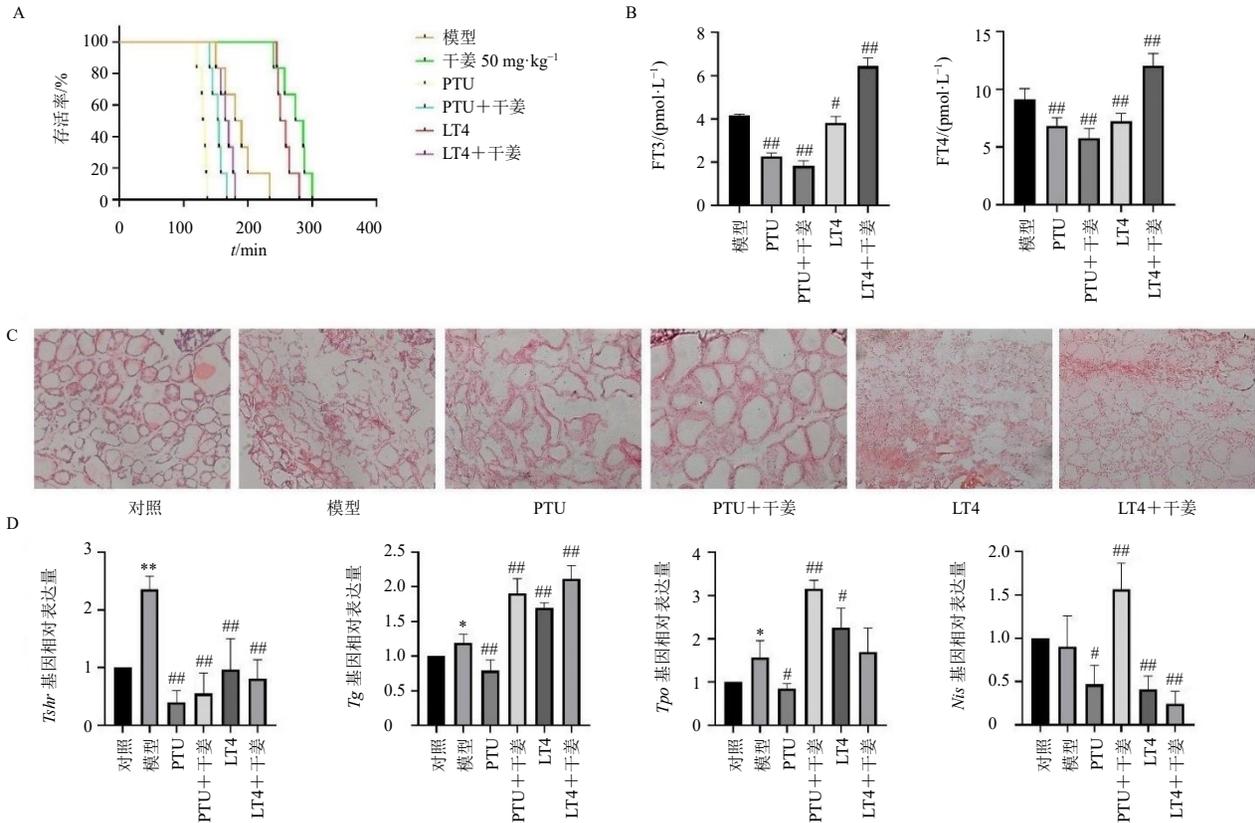


A-小鼠在 $(-20 \pm 1)^\circ\text{C}$ 环境中的生存时间 B-干姜对低温冻伤小鼠血清中 FT3 和 FT4 水平的影响 ($n = 6$) C-干姜对低温冻伤小鼠甲状腺组织病理变化的影响 ($\times 200$) D-干姜对低温冻伤小鼠甲状腺功能相关基因表达的影响 ($n = 3$) 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ### $P < 0.01$ ## $P < 0.01$

A-survival time of mice in environment of $(-20 \pm 1)^\circ\text{C}$ B-effect of dried ginger on levels of FT3 and FT4 in serum of mice with low temperature frostbite C-effect of dried ginger on pathological change of thyroid tissue in mice with low temperature frostbite ($\times 200$) D-effect of dried ginger on 5thyroid function related gene expressions in mice with low temperature frostbite * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group

图 7 干姜对低温冻伤小鼠甲状腺功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 7 Effect of *Zingiberis Rhizoma* on thyroid function in mice with low temperature frostbite ($\bar{x} \pm s$)



A-小鼠在(-20±1)℃环境中的生存时间 B-PTU、LT4及与干姜联合处理对低温冻伤小鼠血清中FT3和FT4水平的影响 C-PTU、LT4及与干姜联合处理对低温冻伤小鼠甲状腺组织病理变化的影响(×200) D-PTU、LT4及与干姜联合处理对低温冻伤小鼠甲状腺功能相关基因表达的影响 与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01; 与模型组比较: #P<0.05 ##P<0.01

A-survival time of mice in environment of (-20 ± 1) °C B-effect of PTU, LT4 and combined treatment with dried ginger on levels of FT3 and FT4 in serum of mice with low temperature frostbite C-effect of PTU, LT4 and combined treatment with dried ginger on pathological change of thyroid tissue in mice with low temperature frostbite (× 200) D-effect of PTU, LT4 and combined treatment with dried ginger on thyroid function related gene expressions in mice with low temperature frostbite *P < 0.05 **P < 0.01 vs control group; #P < 0.05 ##P < 0.01 vs model group

图8 LT4、PTU及与干姜联合处理对低温冻伤小鼠甲状腺功能的影响 (x̄ ± s, n = 6)

Fig. 8 Effect of LT4, PTU and combined treatment with *Zingiberis Rhizoma* on thyroid function in mice with low temperature frostbite (x̄ ± s, n = 6)

FT4水平显著升高(P<0.05、0.01),甲状腺腺泡破损减少。而LT4+干姜组小鼠生存时间明显低于LT4组,说明干姜与LT4联合用药后不利于小鼠机体抗寒,干姜与LT4均可以促进甲状腺激素的分泌,二者联合,可能导致甲状腺激素分泌紊乱导致机体产热失调,使小鼠死亡加快。

3.7 干姜活性成分对甲状腺BCPAP细胞氧化应激的保护作用

如图9所示,模型组小鼠血清、甲状腺组织中H₂O₂水平均明显升高(P<0.01)。如图10所示,与对照组比较,模型组细胞变圆、脱落,各给药组细胞形态均有所恢复。如图11-A所示,与模型组比较,各给药组细胞存活率均明显升高(P<0.01)。如图11-B所示,与对照组比较,模型组细胞内谷胱

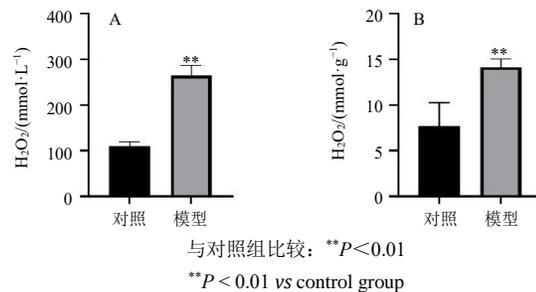


图9 低温冻伤对小鼠血清(A)及甲状腺组织(B)中H₂O₂水平的影响 (x̄ ± s, n = 6)

Fig. 9 Effect of low temperature frostbite on H₂O₂ levels in serum (A) and thyroid tissue (B) of mice (x̄ ± s, n = 6)

甘肽含量下降,活性氧含量上升,细胞凋亡上升;与模型组比较,各给药组谷胱甘肽含量上升,活性氧下降,细胞凋亡下降。如图11-C所示,与模型组

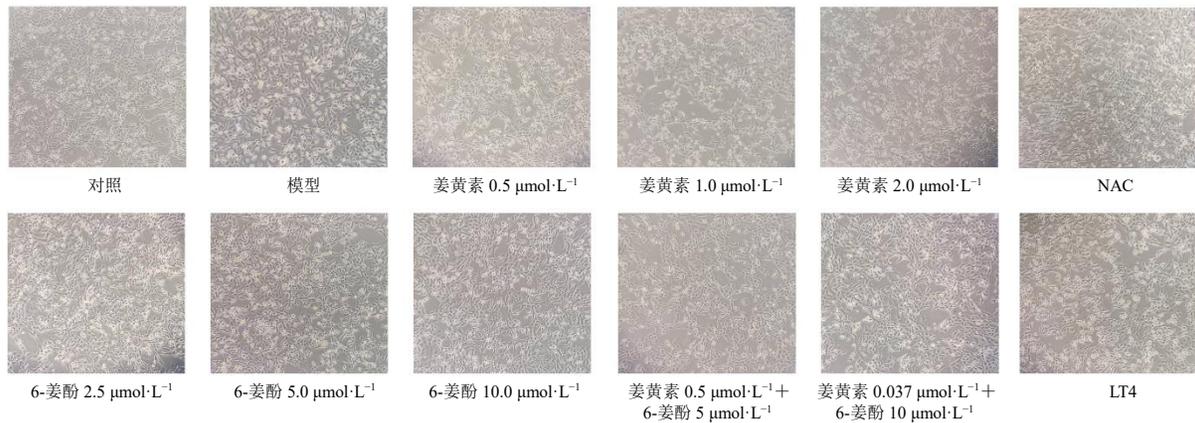
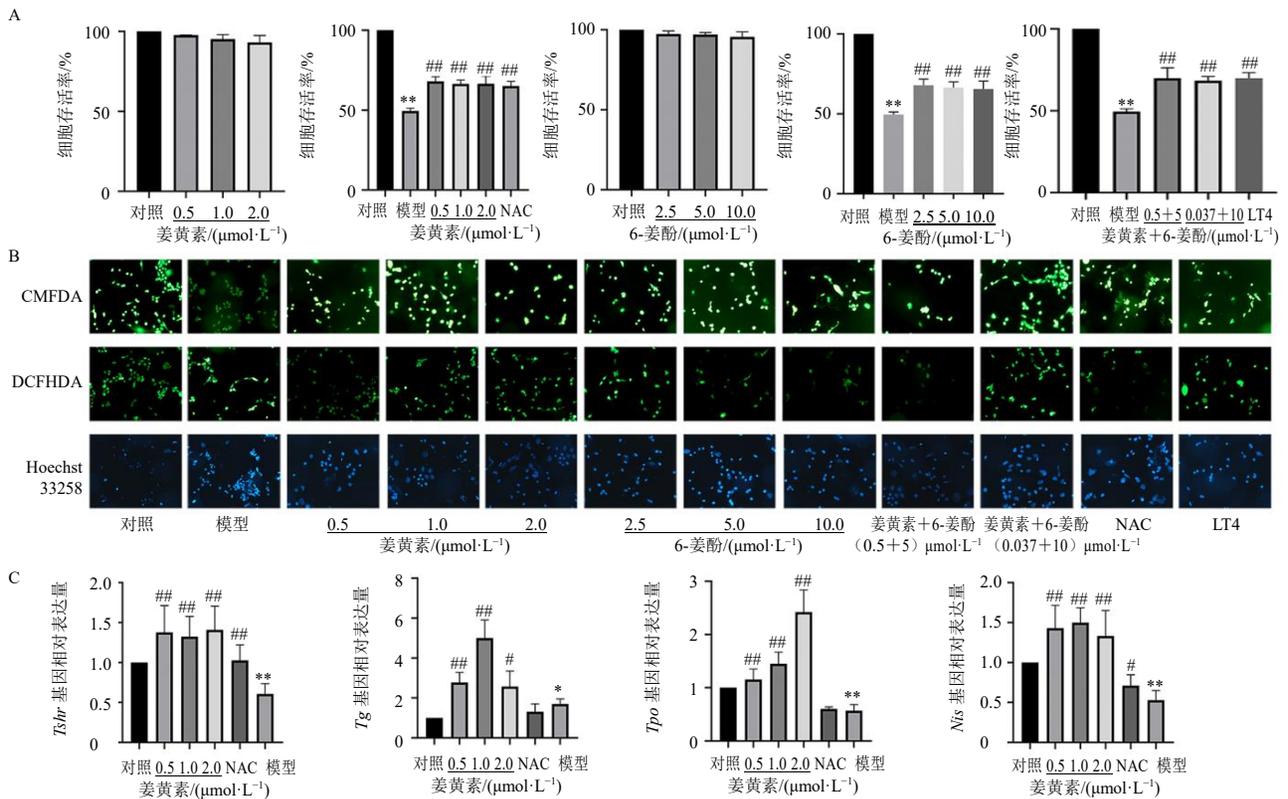


图 10 姜黄素和 6-姜酚对 H₂O₂ 处理的 BCPAP 细胞形态的影响 (×200)

Fig. 10 Effect of curcumin and 6-gingerol on morphology of BCPAP cells treated with H₂O₂ (× 200)



A-正常 BCPAP 细胞及 H₂O₂ 处理的 BCPAP 细胞给予药物预处理 24 h 后, 各组细胞存活率 B-各组细胞 CMFDA、DCFHDA 及 Hoechst 33258 染色结果 (×200) C-姜黄素对 H₂O₂ 处理的 BCPAP 细胞甲状腺功能相关基因表达的影响 与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01; 与模型组比较: #P<0.05 ###P<0.01

A-survival rate of cells in each group after 24 h of drug pretreatment on normal BCPAP cells and H₂O₂-treated BCPAP cells B-CMFDA, DCFHDA and Hoechst 33258 staining results of cells in each group (× 200) C-effect of curcumin on thyroid function-related gene expressions in BCPAP cells treated with H₂O₂ *P<0.05 **P<0.01 vs control group; #P<0.05 ###P<0.01 vs model group

图 11 姜黄素和 6-姜酚对 H₂O₂ 处理的 BCPAP 细胞的保护作用

Fig. 11 Protective effects of curcumin and 6-gingerol on BCPAP cells treated with H₂O₂

比较, 姜黄素组 *Nis*、*Tpo*、*Tg*、*Tshr* mRNA 表达水

4 讨论

平均显著升高 (P<0.05、0.01)。

人作为恒温动物, 机体在对外界环境感知上存

在着动态调整与平衡。超过代偿的寒冷环境暴露会损害皮肤、心脏、甲状腺等涉及到温度调控的多个器官，这与中医描述的寒邪客主、引起里寒症候密切相关^[17]。干姜作为温里药的代表性药物，入《伤寒论》24方次，入《金匱要略》32方次^[18]，提示其在温中散寒方面需要明确其物质基础及作用机制。本研究通过系统药理学方法筛选得到干姜活性成分，选择姜黄素和6-姜酚为代表的成药性分子，姜黄素和6-姜酚均具有提高产热保护低温冷冻小鼠的作用。研究发现，姜黄素通过保护甲状腺延长低温冷冻小鼠生存时间^[3]；6-姜酚通过激活褐色脂肪组织提高产热保护低温冷冻小鼠^[19]；干姜中挥发油类化合物能够促进交感神经、肾上腺系统机能活动增加^[20]；姜辣素对心脏和血管有刺激作用，通过扩张血管，兴奋中枢神经，增加血液循环，使全身温热，对寒症模型大鼠具有温中作用^[21-22]；二苯基庚烷类化合物具有细胞氧化损伤保护作用^[23]。以上均揭示了干姜的物质基础与药性（味）结合辛辣挥发类物质的药效学依据。

基于干姜物质基础对应靶标的网络模块与通路分析结果，干姜活性成分靶标多归集于甲状腺相关通路。甲状腺激素在体内具有广泛的生理作用，主要促进组织氧化及产热，使机体能量代谢维持在一定的水平，调节机体温度的稳定。甲状腺既是重要的产热器官，同时还是冷冻伤害的重要靶器官^[24]。因此低温冷冻条件下对甲状腺的保护至关重要。本课题组前期发现姜黄素具有促甲状腺激素分泌的作用^[3]。本研究中干姜醇提物对冷冻暴露诱导的甲状腺组织的损伤有减轻作用，归因于对甲状腺功能基因表达的调节作用，能够上调 *Nis*、*Tpo*、*Tg* mRNA 表达水平，下调 *Tshr* mRNA 表达水平，使得小鼠甲状腺激素 FT3、FT4 的分泌增加，从而提高甲状腺的促甲状腺激素功能。干姜同 LT4 的正协同与 PTU 的负协同作用，进一步证明了干姜对低温冻伤小鼠保护机制是基于促甲状腺功能。

寒冷是通过皮肤冷感受器经传入神经传到中枢，促进或抑制下丘脑分泌 TRH，进而影响甲状腺素的分泌，促进产热代谢。但这种应激状态的失代偿（过低温度、冷暴露时间过长）在促进甲状腺激素合成的同时，也会诱发甲状腺缺氧代谢，甲状腺激素合成关键酶如过氧化物酶等代谢积累活性氧并引起氧化应激^[25]。Venditti 等^[25]研究发现寒冷引起的甲状腺功能亢进会在大鼠组织中产生氧化损伤，

使甲状腺、心脏、肝脏等发生氧化胁迫。因此调控冷应激中甲状腺活性氧过量积累、减少氧化应激是抗低温保护的关键环节。H₂O₂ 作为甲状腺激素合成的关键因子，当 H₂O₂ 浓度大于甲状腺激素合成所需要时，H₂O₂ 的合成过程就会对甲状腺细胞具有损伤作用。*Tpo*、*Tg* 被认为是甲状腺限制性基因，仅在甲状腺滤泡细胞中存在，而大多人类甲状腺癌细胞中已经丧失了 *Tshr*、*Tpo*、*Tg* 基因的表达，但 BCPAP 细胞未丧失 *Tpo*、*Tg*、*Tshr*、*Nis* 等甲状腺功能相关基因的表达，可以分泌甲状腺激素，具有甲状腺功能^[26-28]。本研究对姜黄素和6-姜酚保护甲状腺 BCPAP 细胞免受 H₂O₂ 氧化损伤的实验进行验证，发现姜黄素（0.5~2 μmol/L）、6-姜酚（2.5~10 μmol/L）可以通过抗氧化对甲状腺细胞具有明显的保护作用，这与李浩铭^[14]研究一致。以上结果表明2种代表成分可能通过上调抗氧化通路，防止细胞氧化应激死亡，进而发挥保甲状腺作用。

综上，温里药干姜通过促进甲状腺激素释放，延长了冷冻处理小鼠的生存时间，与其对甲状腺在低温氧化应激保护密切相关。本研究以干姜为例诠释了温里药在低温冻害防护上的积极意义，为环境医学防护提供证据，为深入了解温里药抵抗低温保护应用提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 夏淑芳. 高脂诱导的氧化应激对甲状腺激素稳态的影响及槲皮素的调节作用 [D]. 无锡: 江南大学, 2015.
- [2] Xie F, Wu Y Y, Duan G J, *et al.* Anti-myocardial ischemia reperfusion injury mechanism of dried ginger-aconite decoction based on network pharmacology [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 609702.
- [3] 李照雪, 胡思远, 王吉焯, 等. 基于促甲状腺功能的姜黄素延长低温冷冻小鼠生存时间的作用机制研究 [J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(9): 1291-1297.
- [4] 徐桐, 丛竹凤, 贺梦媛, 等. 干姜的研究进展及质量标志物分析 [J]. *山东中医杂志*, 2022, 41(5): 569-575.
- [5] Guan L F, Yang H B, Cai Y C, *et al.* ADMET-score-A comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness [J]. *Medchemcomm*, 2019, 10(1): 148-157.
- [6] Wang X, Shen Y H, Wang S W, *et al.* PharmMapper 2017 update: A web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1): W356-W360.
- [7] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4119-4129.

- [8] Ojewole J A. Analgesic, antiinflammatory and hypoglycaemic effects of ethanol extract of *Zingiber officinale* (Roscoe) rhizomes (Zingiberaceae) in mice and rats [J]. *Phytother Res*, 2006, 20(9): 764-772.
- [9] 高伟城, 王小平, 沈晓华, 等. 不同干姜炮制品姜酚类成分含量的研究 [J]. 中医临床研究, 2020, 12(34): 22-25.
- [10] 干婧, 刘枫, 吕世均, 等. 高效液相色谱法测定干生姜中姜黄素的含量 [J]. 食品工业, 2019, 40(4): 305-308.
- [11] Bertin F R, Eichstadt Forsythe L, Kritchevsky J E. Effects of high doses of levothyroxine sodium on serum concentrations of triiodothyronine and thyroxine in horses [J]. *Am J Vet Res*, 2019, 80(6): 565-571.
- [12] Chiang C C, Li Y R, Lai K H, et al. Aqueous extract of Kan-Lu-Hsiao-Tu-Tan ameliorates collagen-induced arthritis in mice by inhibiting oxidative stress and inflammatory responses [J]. *Life*, 2020, 10(12): E313.
- [13] Morinha F, Magalhães P, Blanco G. Standard guidelines for the publication of telomere qPCR results in evolutionary ecology [J]. *Mol Ecol Resour*, 2020, 20(3): 635-648.
- [14] 李浩铭. 两相代谢修饰对姜黄素及6-姜酚保护PC12细胞抗氧化损伤作用的影响研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2020.
- [15] 谢晨, 陈韩英, 钟晶, 等. 紫草素通过上调 Nrf2 途径及干预胞内氧化还原平衡稳态诱导 A549 细胞凋亡 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(10): 1445-1451.
- [16] 梅和平, 石孟琼, 陈茂华, 等. 地连二心颗粒对 H₂O₂ 致小鼠成纤维细胞损伤的保护作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(1): 139-144.
- [17] 屈婷婷, 李瑞玲, 王颖, 等. 慢性寒冷暴露与小鼠心肌及脑血管的改变 [J]. 解剖学报, 2016, 47(1): 80-86.
- [18] 金岚. 张仲景运用干姜的规律研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [19] Wang J, Zhang L, Dong L, et al. 6-Gingerol, a functional polyphenol of ginger, promotes browning through an AMPK-dependent pathway in 3T3-L1 adipocytes [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(51): 14056-14065.
- [20] 秦华珍, 李世阳, 黄燕琼, 等. 干姜、高良姜、丁香 3 种提取物对寒证大鼠交感神经-肾上腺机能的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14): 124-127.
- [21] 项佳媚, 许利嘉, 肖伟, 等. 姜的研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(5): 353-357.
- [22] Liu X, Gao Y P, Shen Z X, et al. Study on the experimental verification and regulatory mechanism of Rougui-Ganjiang herb-pair for the actions of thermogenesis in brown adipose tissue based on network pharmacology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 114378.
- [23] 林振鹏, 李媛婷, 廖小丹, 等. 高良姜提取物不同组分的抗氧化活性比较 [J]. 广东医科大学学报, 2017, 35(6): 606-609.
- [24] 刘梅, 王孝义, 董新星, 等. 冷应激对哺乳动物神经内分泌系统影响的研究进展 [J]. 畜牧兽医杂志, 2020, 39(5): 52-56.
- [25] Venditti P, de Rosa R, Portero-Otin M, et al. Cold-induced hyperthyroidism produces oxidative damage in rat tissues and increases susceptibility to oxidants [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(7): 1319-1331.
- [26] Gonçalves C F L, Hecht F, Cazarin J, et al. The flavonoid quercetin reduces cell migration and increases NIS and E-cadherin mRNA in the human thyroid cancer cell line BCPAP [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2021, 529: 111266.
- [27] Meireles A M, Preto A, Rocha A S, et al. Molecular and genotypic characterization of human thyroid follicular cell carcinoma-derived cell lines [J]. *Thyroid*, 2007, 17(8): 707-715.
- [28] 胡晶桑, 汤加美, 邹珍友, 等. 过量摄食紫菜可减少甲状腺分泌甲状腺素 [J]. 台州学院学报, 2016, 38(3): 47-51.

[责任编辑 李亚楠]