

DOI:10.16305/j.1007-1334.2016.09.022

青黛对实验性自身免疫甲状腺炎大鼠 TGAb、TPOAb 的影响

张 毅, 张 敏

上海市中医医院内分泌科(上海 200071)

【摘要】 目的 通过观察实验性自身免疫甲状腺炎(experimental autoimmune thyroiditis, EAT)大鼠甲状腺球蛋白抗体(TGAb)、甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)、白细胞介素-10(IL-10)及干扰素- γ (IFN- γ)给药前后的变化来探讨青黛对桥本甲状腺炎的疗效及可能机制。**方法** 选取 SD 雌性大鼠 30 只,适应性喂养 1 周,随机取 10 只为正常对照组,剩余为造模组。造模组给予高浓度碘水喂养,正常对照组给予蒸馏水。第 4 周起造模组使用完全弗氏佐剂(CFA)的猪甲状腺球蛋白(pTG)造模,将造模成功后大鼠随机分为模型对照组(10 只)、中药治疗组(10 只)。除正常对照组、模型对照组外,中药治疗组给予青黛水煎剂灌胃治疗。各组实验大鼠于治疗第 42 日后采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测 TGAb、TPOAb、IFN- γ 、IL-10 水平。并取大鼠甲状腺组织行病理切片进行光镜下观察。**结果** 中药治疗组血清 TPOAb、TGAb 浓度较模型对照组下降($P < 0.01$)。与正常对照组比较,所有造模组血清 IL-10 水平降低($P < 0.01$),而中药治疗组 IL-10 的水平比模型对照组升高($P < 0.01$)。与正常对照组比较,模型对照组和中药治疗组 IFN- γ 水平显著升高($P < 0.01$);与模型对照组比较,中药治疗组的 IFN- γ 水平下降($P < 0.01$)。**结论** 青黛通过调节模型大鼠 TGAb、TPOAb、IL-10 及 IFN- γ 水平,从而改善桥本甲状腺炎。

【关键词】 青黛;桥本甲状腺炎;动物实验;大鼠;T 细胞免疫

Research on the effect of Indigo on TGAb、TPOAb of experimental autoimmune thyroiditis rats

ZHANG Yi, ZHANG Min

Department of Endocrinology, Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071

Abstract: Objective To investigate the effect of indigo on Hashimoto's thyroiditis and possible mechanism through comparison of the changes of thyroid globulin antibody (TGAb), thyroid peroxidase antibody (TPOAb), interleukin-10 (IL-10) and interferon- γ (IFN- γ) in experimental autoimmune thyroiditis rats before and after treatment. **Methods** After adaptive feeding for 1 week, 30 SD female rats were randomly divided into the normal control group (10 rats) and modeling group (20 rats). The modeling group was treated with iodine at high concentration, and the normal control group was given distilled water. From 4th week, the modeling group was treated with porcine thyroglobulin (pTG) of complete Freund's adjuvant (CFA) and the successful modeling rats were randomly divided into the model control group (10 rats) and treatment group of traditional Chinese medicine (10 rats). The treatment group were treated with indigo decoction, with a course of 42 days. The levels of serum TGAb, TPOAb, IFN- γ and IL-10 in all groups were tested by ELISA. And the pathological sections of thyroid gland tissue were observed by light microscopy. **Results** After treatment, the serum levels of TPOAb and TGAb in the treatment group were decreased compared with the model control group ($P < 0.01$). Compared with the normal control group, the serum IL-10 levels of all modeling groups were decreased ($P < 0.01$), and the levels of IL-10 in the traditional Chinese medicine treatment group were increased compared with the model control group after treatment ($P < 0.01$). Compared with the normal control group, the level of IFN- γ in the model control group and the traditional Chinese medicine treatment group were significantly increased ($P < 0.01$); compared with the model control group, the IFN- γ level of traditional Chinese medicine treatment group was decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Indigo regulated the level of TGAb, TPOAb, IL-10 and IFN- γ in model rats, which improved Hashimoto's thyroiditis.

Keywords: Indigo; Hashimoto's thyroiditis; animal experiment; rats; T cell immunity

桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)又称为慢性淋巴细胞性甲状腺炎,是自身免疫性甲状腺炎的一种,好发于中老年妇女,女性发病较男性高,男女比例约为 1:6^[1]。患者常有甲状腺疾患家族史。该病是造

成甲状腺功能减退的最常见原因,近年来发病率呈逐步增高趋势。中药对于该病的治疗具有独特疗效。本实验旨在观察中药青黛水煎剂对桥本甲状腺炎模型大鼠甲状腺抗体滴度及病理改变的影响,从而探索青黛对桥本甲状腺炎的防治作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

[基金项目] 上海中医药大学预算内项目(2013JW68)

[作者简介] 张毅,男,博士生,讲师,副主任医师,主要从事自身免疫性甲状腺炎及糖尿病相关并发症研究

1.1.1 动物 SPF 级雌性 SD 大鼠 30 只,体质量 150~200 g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。动物合格证号:SCXK(沪)2013-0016。

1.1.2 药物与试剂 青黛,上海万仕诚国药制品有限公司;猪甲状腺球蛋白(pTG)、完全福氏佐剂(CFA),美国 Sigma 公司;甲状腺球蛋白抗体(TGAb)、甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)、白细胞介素-10(IL-10)及干扰素- γ (IFN- γ)等酶联免疫检测试剂盒,美国 ADL 公司。

1.1.3 仪器 Bio-Rad680 酶标仪,美国伯乐公司;Leica RM2235 石蜡切片机,德国莱卡公司;普通光学显微镜,日本 OLYMPUS 公司。

1.2 造模、分组及给药 造模方法参照文献^[2]将 SD 雌性大鼠 30 只,适应性喂养 1 周,按体质量随机取 10 只为正常对照组,其余大鼠为造模组。第 2 周起造模组大鼠给予饮用 0.005% 高碘水(浓度为 50 mg/L),正常对照组大鼠予饮用蒸馏水。第 4 周起进行造模,将猪甲状腺球蛋白用完全弗氏佐剂充分进行乳化,呈油包水状(TG:CFA=1:1)后对造模组大鼠双侧后足进行皮下多点注射,共 2 次,每次间隔 2 天,每次给予每只大鼠 TG 100 μ g,作为初次免疫。第 5 周在大鼠后背进行皮下多点注射,每次每只大鼠给予 TG 100 μ g,每周注射 1 次,连续注射 4 周,作为加强免疫。到第 8 周结束时完成造模。造模后参考文献^[2]:于造模组及正常对照组各选取大鼠一只,处死后进行检测。如大鼠出现血清 TPOAb、TGAb 异常,或其中一项出现异常,且大鼠甲状腺组织显示炎症变化则视为造模成功。将成模后的大鼠按体质量随机分为模型对照组(10 只)、中药治疗组(10 只)。

中药治疗组给予青黛水煎剂(自制:使用青黛 185.1 g,以 500 ml 水浸泡 30 min 后开大火煮沸;煮沸后,文火煎 15 min,取汁;滤渣后再加适量水,煮沸后,文火煎 15 min。合 2 次药汁共 500 ml 用双层消毒纱布过滤 3 次后分装灭菌,4 $^{\circ}$ C 保存备用)。根据人类和动物体表面积用量,换算等效剂量率表计算出大鼠灌胃

表 1 各组血清 TGAb、TPOAb、IL-10、IFN- γ 含量比较($n=10,\bar{x}\pm s$)

组别	TPOAb(IU/ml)	TGAb(IU/ml)	IL-10(ng/L)	IFN- γ (ng/L)
正常对照组	2.12 $\pm$ 0.99	7.41 $\pm$ 2.47	25.02 $\pm$ 3.02	120.98 $\pm$ 30.30
模型对照组	7.97 $\pm$ 1.62 [*]	29.66 $\pm$ 5.44 [*]	6.09 $\pm$ 2.14 [*]	760.41 $\pm$ 103.71 [*]
中药治疗组	3.07 $\pm$ 1.65 ^{*#}	12.42 $\pm$ 4.33 ^{*#}	13.91 $\pm$ 4.42 ^{*#}	358.14 $\pm$ 169.48 ^{*#}

注:与正常对照组比较,^{*} $P<0.01$;与模型对照组比较,[#] $P<0.01$

2.2 对大鼠炎症评分的影响 与正常对照组比较,模型对照组和中药治疗组炎症评分升高($P<0.01$)。与模型对照组比较,中药治疗组炎症评分水平下降($P<0.01$)。见表 2、图 1。

剂量,每只大鼠灌胃剂量为 10 ml $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹,生药含量为 0.370 2 g/ml。各组均在造模完成后第 15 天开始给药灌胃治疗,共治疗 42 天。全部动物于第 15 周末抽取血液样本后处死,取出甲状腺。

1.3 取材及指标检测

1.3.1 血清 TGAb、TPOAb、IL-10、IFN- γ 含量 治疗后第 42 天,将各组实验大鼠进行腹主动脉取血然后处死。所取血样以转速 1 500 r/min 进行离心获取血清。使用 ELISA 方法检测血清中 TGAb、TPOAb、IL-10、IFN- γ 滴度。

1.3.2 甲状腺组织病理改变 取大鼠甲状腺组织,以 10% 甲醛进行固定,以常规石蜡包埋后进行切片,使用 HE 染色后在光镜下观察甲状腺组织病理形态变化以及病理分级指数。炎症分级标准参照文献^[3],淋巴细胞浸润指数如下:淋巴细胞浸润 <10%、10%~40%、40%~80%、>80%时,指数分别为 1、2、3、4。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件分析处理数据。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,治疗前后各数值自身对照及组间对照比较,采用 t 检验;各组大鼠甲状腺组织淋巴浸润指数比较,采用方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对大鼠血清 TGAb、TPOAb、IL-10、IFN- γ 含量的影响 与正常对照组比较,模型对照组和中药治疗组血清 TGAb、TPOAb 浓度均明显提高($P<0.01$),提示造模成功。与模型对照组比较,中药治疗组血清 TPOAb、TGAb 浓度有所下降($P<0.01$)。与正常对照组比较,模型对照组和中药治疗组血清 IL-10 水平降低($P<0.01$);中药治疗组 IL-10 水平比模型对照组升高($P<0.01$)。与正常对照组比较,模型对照组和中药治疗组 IFN- γ 水平显著升高($P<0.01$);与模型对照组比较,中药治疗组的 IFN- γ 水平下降($P<0.01$)。见表 1。

表 2 各组炎症评分比较($n=10,\bar{x}\pm s$,分)

组别	炎症评分
正常对照组	1.00 $\pm$ 0.00
模型对照组	3.70 $\pm$ 0.48 [*]
中药治疗组	2.80 $\pm$ 0.79 ^{*#}

注:与正常对照组比较,^{*} $P<0.01$;与模型对照组比较,[#] $P<0.01$

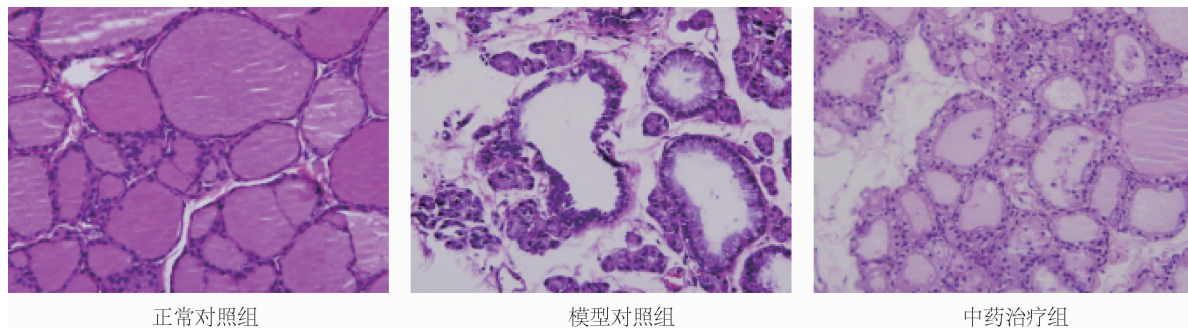


图1 各组甲状腺组织病理切片(HE染色, ×400)

3 讨论

免疫异常是桥本甲状腺炎的重要发病机制。甲状腺免疫反应离不开免疫细胞的参与,其中T细胞发挥了重要作用。T细胞一方面通过T细胞抗原受体识别抗原,活化后产生保护甲状腺滤泡细胞的作用,另一方面,因发生免疫失调或效应T细胞功能异常又会造成甲状腺滤泡细胞受损,炎症反应加剧。 $CD4^+CD25^+$ Treg细胞亚群具有免疫抑制作用,能抑制效应T细胞的增殖,在维持甲状腺免疫平衡方面起到积极意义。Flynn JC等^[4]发现,当高浓度碘化钠影响人类白细胞抗原DR3(HLA-DR3)基因敲除非肥胖糖尿病(NOD)小鼠 $CD4^+CD25^+$ 调节性T细胞后,小鼠甲状腺炎(68%)和血清中抗甲状腺球蛋白(MTG)抗体浓度进行进一步加剧。研究表明,IFN- γ 可以直接破坏甲状腺细胞导致桥本甲状腺炎的发生,甲状腺细胞中IL-18的表达上调可能导致桥本氏甲状腺炎的甲状腺破坏^[5]。而IL-10却能对 $CD4^+CD25^+$ Treg发挥关键作用从而抑制实验性自身免疫性甲状腺炎^[6]。早期发病的桥本甲状腺炎可以不伴任何症状,仅是患者血清中TGAAb和TPOAb水平增高,并可以持续较长时间。韩国的一项研究发现,TPOAb的滴度与桥本甲状腺炎的炎症程度呈正相关,TPOAb的检测是诊断桥本甲状腺炎非常有效的手段^[7]。

桥本氏甲状腺炎可以归为中医学“瘰病”范畴。其发病与七情内伤、饮食不宜及水土不服等有关,由上述因素导致肝气不疏与痰、血瘀等病理产物结于颈前而成病。甲状腺所在咽部为肝经循行部位,因此中医学认为瘰病与肝密切相关。《济生方》云:“夫瘰瘤者,多由喜怒不节,忧思过度而成斯疾焉。”《丹溪心法》提出:“气有余便是火。”肝主疏泄喜调达,肝气不疏则易郁而化火,肝火循经凝于颈前则发为本病。故本病早期可出现心悸易怒、多汗等肝火上扰症状。本实验从肝气郁结、肝火内生角度使用青黛水煎剂治疗该病。

青黛性寒味咸,归肝经,可清热解毒、凉血消斑、泻火定惊,主要用于治疗温毒发斑、血热吐衄、胸痛咯血。

其有效成分靛玉红被广泛运用于治疗肿瘤尤其是慢性粒细胞性白血病。近年来的研究发现,青黛在调节免疫方面效果突出,日本学者Kunikata T等发现青黛具有抑制干扰素- γ 活性的作用^[8]。韩国的Kim JK研究表明,靛玉红可抑制白细胞介素IL-1 β 和IL-6的促炎症细胞因子的释放,可用于治疗各种炎症性疾病^[9]。

本研究结果显示,模型对照组和中药治疗组的血清TPOAb、TGAAb水平均高于正常对照组。而桥本甲状腺炎的发病早期阶段可能不伴有任何症状,仅仅是血清TGAAb、TPOAb增高,并可以持续很长时间。这两个抗体的检测对本病的诊断有特殊意义。据此,判断造模成功。中药治疗组经过中药灌胃治疗后的血清TPOAb、TGAAb水平较模型对照组下降($P < 0.01$),提示经中药治疗后大鼠的桥本甲状腺炎得到一定的控制。病理切片显示,造模组的大鼠甲状腺组织细胞出现了甲状腺滤泡变小、萎缩,细胞腔内胶质变少同时伴有上皮细胞的肿胀和增大,胞浆呈嗜酸染色反应,从侧面验证了造模的成功。经过中药治疗后,中药治疗组相对模型对照组,其细胞形态有所改善。提示青黛水煎剂对桥本甲状腺炎的治疗是有效的,这与临床观察的结果一致^[10]。

免疫异常是桥本甲状腺炎的重要发病机制,甲状腺免疫反应离不开免疫细胞的参与,其中T细胞发挥了重要作用。研究发现,IL-10对于Th1产生INF- γ 具有关键的作用^[11]。本实验结果显示,造模后模型对照组的IL-10均比正常对照组下降,而经过治疗后的中药治疗组IL-10水平较模型对照组有所上升,说明IL-10的水平与桥本甲状腺炎有相关性,与既往的文献报道结果相一致^[6]。同样造模后,模型对照组INF- γ 水平较正常对照组升高,提示INF- γ 水平与桥本甲状腺炎相关,与以往文献报道的 γ -干扰素(INF- γ)具有直接作用于桥本甲状腺炎的导致甲状腺被破坏结果相一致^[5];而经过治疗后,中药治疗组的INF- γ 水平明显下降($P < 0.01$)。

那么,通过抑制INF- γ 来改善桥本甲状腺炎是否

是青黛起作用的唯一途径呢? 需要进一步的研究来证实。实验中还观察到 IL-10 水平的改变,而 IL-10 可以对 CD4⁺CD25⁺Treg 发挥关键作用从而抑制桥本甲状腺炎的发生,那么 CD4⁺CD25⁺Treg 途径是否也是青黛起作用的途径呢? 这尚有待于进一步深入研究。

参考文献:

[1] Wang Y, Zhu YF, Wang Q, *et al.* The haplotype of UBE2L3 gene is associated with Hashimoto's thyroiditis in a Chinese Han population [J]. BMC Endocr Disord, 2016 (16):18.

[2] 余江毅. 温肾方对小鼠自身免疫性甲状腺炎治疗作用的实验研究 [J]. 中医杂志, 2003, 44(5):377.

[3] Tang H, Mignon Godefroy K, Meroni PL, *et al.* The effects of a monoclonal antibody to interferon-gamma on experimental autoimmune thyroiditis (EAT): prevention of disease and decrease of EAT-specific T cells [J]. Eur J Immunol, 1993, 23(1):275-278.

[4] Flynn JC, Meroueh C, Snower DP, *et al.* Depletion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells exacerbates sodium iodide-induced experimental autoimmune thyroiditis in human leucocyte antigen DR3 (DRB1 * 0301) transgenic class II-knock-out non-obese diabetic mice [J]. Clin Exp Immunol, 2007, 147(3):547-554.

[5] Liu Z, Wang H, Xiao W, *et al.* Thyrocyte interleukin-18 expression is up-regulated by interferon- γ and may contribute to thyroid destruction in Hashimoto's thyroiditis [J]. Int J Exp Pathol, 2010, 91(5):

420-425.

[6] Gangi E, Vasu C, Cheatem D, *et al.* IL-10-producing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells play a critical role in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced suppression of experimental autoimmune thyroiditis [J]. J Immunol, 2005, 174(11):7006-7013.

[7] Rho MH, Kim DW, Hong Hp, *et al.* Diagnostic value of antithyroid peroxidase antibody for incidental autoimmune thyroiditis based on histopathologic results [J]. Endocrine, 2012, 42(3):647-652.

[8] Kunikata T, Tatefuji T, Aga H, *et al.* Indirubin inhibits inflammatory reactions in delayed-type hypersensitivity [J]. Eur J Pharmacol, 2000, 410(1):93-100.

[9] Kim JK, Park GM. Indirubin-3-monoxime exhibits anti-inflammatory properties by down-regulating NF- κ B and JNK signaling pathways in lipopolysaccharide-treated RAW264.7 cells [J]. Inflamm Res, 2012, 61(4):319-325.

[10] 张毅, 张敏, 黄宁静. 外用青黛治疗桥本氏甲状腺炎疗效及其对甲状腺自身免疫性抗体的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(11):24-27.

[11] Rodríguez-Muñoz A, Vitales-Noyola M, Ramos-Levi A, *et al.* Levels of regulatory T cells CD69(+) NKG2D(+) IL-10(+) are increased in patients with autoimmune thyroid disorders [J]. Endocrine, 2016, 51(3):478-489.

编辑:季春来
收稿日期:2016-05-03

· 管窥篇 ·

医方集锦

胃下垂头痛眩晕案

四十余岁少妇杨太太,平素身体虚弱,以中医的看法则属于阴虚证体质。即体格瘦削、面色苍白、唇口血色缺乏、身体手足易冷。平素有胃病,容易膨满疝痛,动辄下水泄痢。口内经常冷淡,绝对不敢饮冷,此外则居恒头重眩晕耳鸣。

以上症状,为中年常有之病,大底用人参汤一二剂便得小康。如是在我的诊治下荏苒一二年,时发时止。投以桂枝人参汤合厚朴温中汤二剂,症状去十之七八。然翌日眩晕更甚,全身手足振颤如欲仆地状,乃转用单方真武汤,二剂全治。

——朱木通《中医临床廿五年——朱木通经方医案》