

穿山龙水溶性总皂苷对实验性桥本甲状腺炎大鼠 Th1 / Th2 型细胞因子表达的影响

曹拥军 罗燕萍 徐作俊 李虹 蒋晟昱

(南京中医药大学南通附属医院内分泌科, 江苏南通 226001)

摘要 目的:探讨穿山龙水溶性总皂苷对实验性桥本甲状腺炎大鼠的可能作用机制。方法:将 40 只 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组和穿山龙低、中、高剂量组,每组 8 只,除正常组外其余各组采用猪甲状腺球蛋白与弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂皮下注射 6 周诱导桥本甲状腺炎动物模型。造模后穿山龙低、中、高剂量组分别给予穿山龙水溶性总皂苷 60、120、240mg/(kg·d)灌胃,每日 1 次,共 8 周;正常组及模型组给予等量蒸馏水灌胃。检测各组大鼠血清甲状腺球蛋白抗体(TgAb)、甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)、白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-4(IL-4)的表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠 TgAb、TPOAb、IL-2 水平明显升高,IL-4 水平明显降低($P<0.05$);与模型组比较,穿山龙低、中、高剂量组大鼠 TgAb、TgAb 水平明显降低,IL-4 水平明显升高($P<0.05$)。结论:穿山龙水溶性总皂苷能降低甲状腺自身抗体,其可能通过降低 IL-2 的表达、升高 IL-4 的表达而调节 Th1/Th2 的失衡。

关键词 桥本甲状腺炎 穿山龙 皂苷 白细胞介素-2 白细胞介素-4 Wistar 大鼠 雄性

中图分类号 R581.405 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2016)02-0081-03

桥本甲状腺炎(Hashimoto thyroiditis,简称 HT)又称慢性淋巴细胞性甲状腺炎,是临床最常见的自身免疫性甲状腺病,以体内生成特异性甲状腺自身抗体和甲状腺内存在浸润的淋巴细胞,导致甲状腺组织结构破坏和甲状腺功能低下为主要特点^[1]。近年来,HT 的发病率逐渐升高,且发病呈现年轻化趋势。目前临床上对 HT 甲状腺功能减低的治疗方案主要是甲状腺激素替代治疗,尚无针对病因的治疗措施。HT 是自身免疫性疾病,甲状腺滤泡破坏的直接原因是甲状腺细胞凋亡,研究表明 Th1/Th2 细胞比例失衡是本病的发病机制之一^[2]。穿山龙具有抗炎、免疫调节等多种功能^[3],我们前期就穿山龙对 HT 患者 Th1/Th2 型细胞因子表达的影响进行了相关研究,结果表明穿山龙能降低 HT 患者甲状腺过氧化物酶抗体(Thyroid peroxidase antibody,简称 TPOAb)、甲状腺球蛋白抗体(Thyroglobulin antibodies,简称 TGAb)的滴度,改善 Th1/Th2 失衡状态。本研究建立 HT 大鼠模型,观察穿山龙薯蓣对 HT 模型大鼠甲状腺自身抗体的影响及对 Th1 及 Th2 类细胞的免疫调节作用。

1 实验材料

1.1 实验动物 健康清洁级 Wistar 雌性大鼠 40 只,6~8 周龄,体重 180~200g,由南通大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(苏)2014-0020,实验动物使用许可证号:SYXK(苏)2002-0022。

1.2 药物与试剂 穿山龙水溶性总皂苷由陕西西安东盛制药厂提供。猪甲状腺球蛋白(PTg,批号:T1126)、完全弗氏佐剂(CFA,批号:F5881)、不完全弗氏佐剂(IFA,批号:F5506)均为美国 Sigma 公司产品。TgAb(批号:RT025854A)、TPOAb(批号:RT006857A)、白细胞介素-2(IL-2,批号:RT073345A)及白细胞介素-4(IL-4,批号:RT099364A)酶联免疫检测试剂盒均为美国 R&D 公司产品。

2 实验方法

2.1 分组与造模 大鼠购回后适应性饲养 1 周,采用随机数字表法分成正常组、模型组及穿山龙低、中、高剂量组,每组 8 只。除正常组外,其余各组大鼠参照文献[4]的方法造模。将 PTg 用 PBS 缓冲液溶解成含量为 2mg/mL 的溶液,与 CFA 等体积混合充分乳化,在大鼠足垫部皮下注射,100g/只,作为初次免疫。1 周后加强免疫,取上述溶解的 PTg 与 IFA 等体积混合乳化,在大鼠四肢内侧及背部皮下多点注射,100g/只,每周加强 1 次至第 6 周结束。

2.2 给药 造模结束后即第 7 周起,穿山龙低、中、高剂量组分别给予穿山龙水溶性总皂苷 60、120、240mg/(kg·d),正常组及模型组给予等量蒸馏水,每日灌胃 1 次,共灌胃 8 周。

2.3 指标检测 各组大鼠于第 15 周心脏取血,1500r/min 离心获取血清,按照 TGAb 和 TPOAb 测定

试剂盒说明书采用放射免疫法测定 TGA b、TPOAb。使用 IL-2 及 IL-4 酶联免疫检测试剂盒,按照说明书进行操作,采用 ELISA 法检测 IL-2、IL-4。

2.4 统计学方法 采用 SPSS16.0 for Windows 统计分析软件处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,符合正态分布计量资料采用 T 检验,不符合正态分布计量资料采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠血清 TGA b、TPOAb 水平比较 与正常组比较,模型组大鼠 TGA b、TPOAb 显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,穿山龙低、中、高剂量组大鼠 TGA b、TPOAb 明显下降($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠甲状腺相关抗体水平比较($\bar{x} \pm s$) IU/mL

组别	动物数(只)	TGA b	TPOAb
正常组	8	172.68±8.18	84.48±4.82
模型组	8	208.20±14.82**	98.52±5.02**
穿山龙低剂量组	8	186.78±7.42 Δ	88.26±4.78 Δ
穿山龙中剂量组	8	184.84±7.28 Δ	90.02±5.14 Δ
穿山龙高剂量组	8	188.20±8.56 Δ	89.12±4.82 Δ

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

3.2 各组大鼠血清 IL-2、IL-4 水平比较 与正常组比较,模型组大鼠 IL-2 显著升高、IL-4 显著下降($P < 0.01$);与模型组比较,穿山龙低、中、高剂量组大鼠 IL-2 明显下降,IL-4 显著上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠血清 IL-2、IL-4 水平比较($\bar{x} \pm s$) ng/L

组别	动物数(只)	IL-2	IL-4
正常组	8	776.45±12.86	228.46±10.02
模型组	8	864.24±48.78**	192.26±8.25**
穿山龙低剂量组	8	820.48±26.84 Δ	206.35±12.24 Δ
穿山龙中剂量组	8	814.28±25.62 Δ	208.42±11.12 Δ
穿山龙高剂量组	8	816.76±27.20 Δ	203.05±13.27 Δ

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

4 讨论

桥本甲状腺炎为自身免疫性疾病,患者甲状腺内主要为 T 细胞浸润,产生大量细胞因子,表明细胞免疫介导的自身免疫反应参与了桥本甲状腺炎的发病^[1]。Th1 主要分泌 Th1 型细胞因子,包括 IFN- γ 、TNF、IL-2 等,它们能促进 Th1 的进一步增殖,进而发挥细胞免疫的效应,同时还能抑制 Th2 增殖。Th2 主要分泌 Th2 型细胞因子,包括 IL-4、IL-5、IL-10 及 IL-13 等,它们能促进 Th2 细胞的增殖,进而辅助 B 细胞活化,发挥体液免疫的作用,同时抑制 Th1 增殖^[6]。Th1 细胞和 Th2 细胞各有不同的防御功能,它们的正反馈机制对迅速放大机体的免疫功能、尽快有效地启动特异性免疫系统和消除病原体或抗原很有必要。然而,倘若免疫应答的保护使命趋于完

成,而机体没有相应的反向调节机制进行有效的阻遏,则势必会造成病理损伤,从而导致相关疾病的发生^[7]。Th1 细胞在 HT 发病中起主导作用,Th2 细胞起保护作用,Th1/Th2 细胞因子体内失衡与 HT 发病密切相关^[8]。

桥本甲状腺炎可归属于中医学“瘰病”“虚劳”等范畴,发病部位主要在甲状腺。甲状腺在颈前结喉处,为肝经所属。肝主疏泄,中藏相火,从病因看,情志变化是本病最主要的致病因素,正如《诸病源候论》云:“瘰者由忧悲气结而生”,气滞痰凝血滞为其主要病机,故在治疗上予以理气化痰活血为主。穿山龙性平,味苦,具有祛风除湿、活血通络、止咳平喘之功效^[9],用于痰瘀互结、气机阻滞导致的桥本氏甲状腺炎可祛痰软坚、活血祛瘀^[10]。现代药理研究表明,穿山龙含多种甾体皂苷,本研究所使用的穿山龙水溶性总皂苷与甾体激素类药物结构相近,是合成甾体激素的主要原料之一^[11]。

HT 的特征是存在高滴度的自身抗体 TGA b 和 TPOAb^[12]。其中 TPOAb 是 HT 的重要标志性抗体。HT 患者外周血中 TPOAb 的升高,是甲状腺功能损伤的原因之一^[13]。研究表明,甲状腺自身抗体是桥本甲状腺炎诊断、预测疾病发展及预后的重要指标^[14-15],同时也与甲状腺眼病等并发症密切相关,对其早期诊断、治疗和随访有很大价值^[16]。HT 的治疗除应维持甲状腺功能正常外,还应着眼于降低甲状腺抗体浓度。临床应用糖皮质激素等纠正免疫功能紊乱,虽然有效,但停药后易反复,且副反应多^[17]。本研究结果显示,穿山龙低、中、高剂量组大鼠 TPOAb、TGA b 水平较模型组明显下降,证实穿山龙水溶性总皂苷能阻止抗体继续增高,对缓解甲状腺的炎症反应,防止甲状腺组织进一步破坏起到了一定的作用,与临床观察结果一致。且穿山龙水溶性总皂苷能够降低 IL-2,升高 IL-4,证明其治疗 HT 的有效性,可能的作用机制是通过调节免疫的途径,抑制 Th1 细胞功能的过度亢进,促使 Th1 向 Th2 漂移。桥本甲状腺炎免疫发病机制极其复杂,穿山龙水溶性总皂苷调节免疫应答的具体分子机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 葛均波,徐永健.内分泌学[M].北京:人民卫生出版社,2013:697.
- [2] 毛金媛,范晨玲,关海霞,等.桥本甲状腺炎 Th1/Th2 平衡偏移的研究[J].中国实用内科杂志,2006,26(8):589.
- [3] 于海荣,王济兴,张凤英,等.穿山龙总皂苷对大鼠 T 淋巴细胞功能影响的血清药理学研究[J].时珍国医国药,2006,17(9):1653.

(下转第 85 页)

病,增强治疗的信心,加强锻炼,增强体质,也是十分必要的。

参考文献

- [1] 徐云霞,李伟莉.慢性盆腔炎中医药治疗研究近况[J].中医药临床杂志,2009,21(1):85.
- [2] 宋艳萍.中西医结合治疗慢性盆腔炎的观察及护理[J].吉林医学,2010,31(25):4415.
- [3] 田永杰,汤春生.急性慢性盆腔炎的药物治疗[J].中国实用妇科与产科杂志,2003,19(9):524.
- [4] 刘震坤,金影.应用中药保留灌肠治疗慢性盆腔炎的临床观察[J].中国社区医师,2008(7):41.
- [5] 李杨.中药灌肠治疗慢性盆腔炎45例疗效观察[J].中外医学研究,2011,9(20):57.
- [6] 黄冬梅,司瑞超.中药灌肠治疗慢性盆腔炎疗效观察与护理体会[J].光明中医,2015,30(4):861.
- [7] 顾华.中药灌肠治疗盆腔炎疗效观察[J].光明中医,2010,25(9):1611.
- [8] 胡国玲,王鑫.盆腔炎治疗仅配中药阴道给药治疗慢性盆腔炎52例[J].陕西中医,2007,28(10):1348.
- [9] 张东玲.中药外敷治疗盆腔炎81例[J].中国疗养医学,2014,23(4):347.
- [10] 郭明霞,姜晶,张淑英,等.中药外敷治疗慢性盆腔炎90例[J].中医外治杂志,2011,21(3):27.
- [11] 苏兰芬.中药外敷治疗慢性盆腔炎的临床疗效及护理[J].内蒙古中医药,2014,10:146.
- [12] 倪勇艳,万贵平,苟爱华,等.慢性盆腔炎性疾病应用中药离子导入疗效观察[J].辽宁中医药大学学报,2015,17(10):139.
- [13] 胡艳玲,张洁,曹晓娟,等.中药离子导入治疗慢性盆腔炎的效果观察[J].实用妇科内分泌杂志,2015,2(5):67.
- [14] 谢凯.针刺配合中药离子导入治疗急性盆腔炎56例[J].山东中医杂志,2010,29(6):394.
- [15] 许梅芳,瞿真.艾灸箱联合中医定向透药治疗仪治疗慢性盆腔炎的疗效观察[J].临床合理用药,2015,8(2A):91.
- [16] 刘宏俊,李晋霞,郭志芳.温针灸治疗慢性盆腔炎30例[J].中医外治杂志,2013,22(6):46.
- [17] 陆菁,沈群.针刺为主治疗慢性盆腔炎临床观察[J].上海针灸杂志,2013,32(8):644.
- [18] 卢金荣,王威岩.温针灸治疗慢性盆腔炎的临床观察[J].中国中医药科技,2015,22(6):698.
- [19] 饶沁,程元妹,李青,等.中医综合治疗慢性盆腔炎50例临床观察[J].中国民族民间医药,2015,24(14):94.
- [20] 徐国权,黄芬,封红灵.中药内服合中药灌肠治疗气滞血瘀型慢性盆腔炎32例总结[J].湖南中医杂志,2015,31(7):62.
- [21] 姜跃林.中药保留灌肠结合中药外敷治疗盆腔炎性疾病后遗症疗效观察[J].湖北中医杂志,2015,37(1):15.

第一作者:王春环(1979—),女,医学硕士,主治医师,研究方向为中医妇科。

通讯作者:李维民,本科学历,教授。nkzlm@126.com

收稿日期:2015-12-02

编辑:傅如海

(上接第82页)

- [4] VERGINIS P,STANFORD M M,CARAYANNIOTIS G. Delineation of five thyroglobulin T cell epitopes with pathogenic potential in experimental autoimmune thyroiditis[J].J Immunol,2002,169(9):5332.
- [5] 陈家伦.临床内分泌学[M].上海:上海科学技术出版社,2011:388.
- [6] 曹雪涛.医学免疫学[M].北京:人民卫生出版社,2013:89.
- [7] 李丽琴,杨星,冯珏.自身免疫性甲状腺疾病与Th1/Th2细胞因子的关系[J].医学综述,2006,12(19):1160.
- [8] 许峥嵘,李昭瑛.桥本甲状腺炎与Th1/Th2细胞因子[J].医学综述,2006,12(24):1492.
- [9] 王庆浩,陈如泉,方居正.穿山龙对Graves'病大鼠甲状腺激素的影响[J].中医药学报,2007,35(2):26.
- [10] 江苏新医学院.中药大词典(下册)[M].上海:上海人民出版社,1977:1012.
- [11] 陈延镛.甾体皂甙元的生产现状[J].医药工业,1985(1):32.
- [12] 叶廷军,毛敏静,樊绮诗,等.桥本甲状腺炎患者白介素-2及受体与甲状腺过氧化物酶抗体的关系[J].诊断学理论与实践,2008,7(2):165.
- [13] 张良岩,李传红,陆诗清,等.地塞米松局部治疗对桥本甲状腺功能减退症患者甲状腺的影响[J].中华内分泌外科杂志,2011,5(4):250.
- [14] DOWNS H,MEYER A A,FLAKE D,et al.Clinical inquiries:How useful are autoantibodies in diagnosing thyroid disorders[J].J Fam Pract,2008,57(9):615.
- [15] FINK H,HINTZE G.Autoimmune thyroiditis (Hashimoto's thyroiditis):current diagnostics and therapy[J].Med Klin (Munich),2010,105(7):485.
- [16] 孙贞,朱烨,何铭珺,等.甲状腺自身抗体与甲状腺相关性眼病的关系[J].中国免疫学杂志,2008,24(4):371.
- [17] 张敏,张毅.益气化痰消瘰法对桥本甲状腺炎患者血清甲状腺球蛋白抗体、甲状腺过氧化物酶抗体的影响[J].中医杂志,2007,48(5):414.

第一作者:曹拥军(1980—),男,博士研究生,副主任中医师,研究方向为中西医结合内分泌疾病基础与临床。

通讯作者:蒋晟昱,硕士,副主任中药师。1904014984@qq.com

收稿日期:2015-10-01

编辑:吴宁