

阳和汤对自身免疫性甲状腺炎大鼠甲状腺结构及甲状腺自身抗体的影响

董笑克 邓莉 白颖 洪明昭 秦灵灵 孙文 郭璇 吴丽娟 许光远 刘铜华

【摘要】 目的 观察阳和汤对自身免疫性甲状腺炎模型大鼠甲状腺组织结构及甲状腺自身抗体的影响。**方法** 选取 Lewis 大鼠 30 只,正常组 10 只,其余 20 只大鼠采用高碘饮食联合猪甲状腺球蛋白皮下注射的方法建立自身免疫性甲状腺炎动物模型,造模成功大鼠分为模型组和中药组,干预 8 周后采用放免法检测大鼠甲状腺功能及甲状腺球蛋白抗体(thyroglobulin antibody, TGA),采用酶联免疫吸附测定检测甲状腺过氧化物酶抗体(thyroid peroxidase antibody, TPOAb),甲状腺组织石蜡包埋切片,HE 染色。**结果** 与正常组相比,模型组及中药组大鼠促甲状腺激素(TSH)明显降低,血清游离甲状腺素(FT_4)及 TPOAb、TGA 明显升高,均具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组大鼠相比,中药组大鼠 TPOAb、TGA 降低,有统计学意义($P < 0.01$);中药组大鼠 TPOAb 治疗前后差值,与正常组及模型组相比均具有明显差异($P < 0.01$);中药组大鼠甲状腺组织切片与模型组相比,淋巴细胞浸润程度及甲状腺滤泡细胞破坏均减少。**结论** 阳和汤可降低自身免疫性甲状腺炎大鼠甲状腺自身抗体,减少甲状腺组织淋巴细胞浸润程度,保护甲状腺滤泡细胞等作用。

【关键词】 阳和汤; 自身免疫性甲状腺炎; 血清甲状腺过氧化物酶抗体

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.06.004

Effect of Yanghe decoction on thyroid structure and thyroid autoantibodies of autoimmune thyroiditis rats DONG Xiaoke, DENG Li, BAI Ying, et al. Second Clinical Medical School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China

Corresponding author: LIU Tonghua, E-mail: thliu@vip.163.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of Yanghe decoction on thyroiditis structure and thyroid autoantibodies of autoimmune thyroiditis rats. **Methods** 30 Lewis rats were selected, 10 rats in the normal group, the remaining 20 rats were fed with high iodine diet combine with subcutaneous injection with porcine thyroglobulin to establish autoimmune thyroiditis model. The successful model rats were divided into model group and traditional Chinese medicine (TCM) group, after 8 weeks of intervention, the thyroid function and thyroid globulin antibody (TGA) were detected by radioimmunoassay (RIA), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect thyroid peroxidase antibody (TPOAb), thyroid tissue was embedded in paraffin and stained with HE. **Results** Compared with normal group, TSH of model group and TCM group were significantly decreased while the FT_4 , TPOAb, TGA were increased, the results had statistically significant ($P < 0.01$); compared with model group, TPOAb and TGA of TCM group was lower, the results had statistical significance ($P < 0.01$); D-value of TPOAb in before and after

基金项目:国家国际科学合作专项(2015DFA30910);教育部大学生创新训练计划(201510026002)

作者单位:100029 北京中医药大学第二临床医学院[董笑克(硕士研究生)、白颖(硕士研究生)、洪明昭(硕士研究生)、郭璇(博士研究生)、许光远(博士研究生)];沧州中西医结合医院东院区疮疡脉管病科(邓莉);北京中医药大学科技处(秦灵灵);北京中医药大学教育部中医养生学重点实验室(孙文);北京中医药大学研究生院(刘铜华);成都中医药大学临床医学院[吴丽娟(博士研究生)]

作者简介:董笑克(1992-),女,2015 级在读硕士研究生。研究方向:糖尿病及甲状腺疾病的中医药防治。E-mail:1025399335@qq.com

通信作者:刘铜华(1963-),博士,教授,博士生导师。研究方向:糖尿病及甲状腺疾病的中医药防治。E-mail:thliu@vip.163.com

the treatment of TCM group had obvious difference compared with the normal group and the model group ($P < 0.01$); compared with the model group, the degree of lymphocyte infiltration and the destruction of thyroid follicle cells were decreased in the thyroid tissue sections of the TCM group. **Conclusion** Yanghe decoction can reduce thyroid autoantibodies and the degree of thyroid lymphocyte infiltration, and can protect the thyroid follicular cells in autoimmune thyroiditis rats.

【Key words】 Yanghe decoction; Autoimmune thyroiditis; TPOAb

自身免疫性甲状腺炎 (autoimmune thyroiditis, AIT) 亦称慢性淋巴细胞浸润性甲状腺炎、桥本氏病, 是一种器官特异性自身免疫病, 其特征性改变是甲状腺内有大量的淋巴细胞浸润, 血清甲状腺过氧化物酶抗体 (thyroid peroxidase antibody, TPOAb) 和/或甲状腺球蛋白抗体 (thyroglobulin antibody, TGAAb) 水平升高, 甲状腺功能可以正常或亢进、亚临床甲减和临床甲减。目前对 AIT 尚无任何确切有效的治疗方法, 仅能对已经发生甲减的患者给予甲状腺激素替代治疗。西医治疗多使用免疫调节药物糖皮质激素 (地塞米松^[1-2]、泼尼松^[3])、免疫抑制剂 (雷公藤多苷^[4]、甲氨蝶呤^[5])、硒制剂^[6-7]、维生素 D3^[8] 等, 但上述药物疗效尚不理想, 且存在较多的不良反应, 临床应用较少。中药因其治疗自身免疫性甲状腺炎具有疗效确切、不良反应小、禁忌证少等优点, 目前在临床上应用越来越广泛^[9]。本病后期可出现畏寒肢冷、少气懒言、疲乏无力、水肿等一派阳虚症状, 研究表明温阳化痰法治疗自身免疫性甲状腺炎, 可使甲状腺嗜酸性病变细胞下降, 提示阳和汤也有修复或帮助修复小鼠病变甲状腺细胞的功能^[10]。本研究以 Lewis 大鼠为对象, 探究阳和汤对自身免疫性甲状腺炎模型大鼠自身抗体及甲状腺形态结构的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 Lewis 雌性大鼠 30 只, 7 周龄, 体重 (120±10) g, 由维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物生产许可证号: SCXK (京) 2012-0001。动物饲料选用普通大鼠生长繁殖饲料, 由维通利华提供。动物饲养于北京中医药大学动物房, 5 只/笼, 保证正常光照节律、温度适度、环境安静。

1.2 实验药物及试剂

阳和汤配方颗粒组成: 熟地黄 30 g、肉桂 3 g、麻黄 2 g、鹿角胶 9 g、白芥子 6 g、姜炭 2 g、生甘草 3 g, 购自北京中医药大学东方医院颗粒药房, 生产厂家: 北京康仁堂有限公司。

猪甲状腺球蛋白 (pTg) (货号: T1126)、完全弗氏佐剂 (CFA) (货号: F5506)、不完全弗氏佐剂 (IFA) (货号: F5881), 均购自美国 SIGMA 公司。大鼠甲状腺球蛋白酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (货号: CSB-E11199R, 武汉华美生物工程有限公司)。碘化钠 (批号: 20039818, 国药集团化学试剂有限公司)。弗氏 (完全/不完全) 佐剂的配制方法: 取适量 pTg 与溶于 PBS 配制 2 mg/mL 的溶液, 并与等体积的弗氏 (完全/不完全) 佐剂完全混匀, 充分乳化, 完全乳化标准为: 滴一滴乳化剂于水面上, 半小时内仍呈球状, 不散开为乳化成功标志, 乳化剂中抗原含量为 1 mg/mL。高碘水配置方法: 0.64 g 水溶于 1 L 去离子水中。

1.3 实验仪器

4℃ 低温高速离心机 (型号: 3K15, 德国 sigma 公司); 电子读数分析天平 (上海民桥精密科学仪器有限公司); 光学显微镜 (型号: L340099, Olympus 公司); 酶联免疫检测仪 (Tecan); 恒温箱 (Sanyo); 普通手术器械、体质量秤等。

1.4 动物模型的建立

30 只大鼠于室温 18~22℃ 环境下适应 1 周, 并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。将大鼠随机分为两组, 空白对照组 10 只, 实验组 20 只。1 周后实验组大鼠开始造模, 第 1 周于周二、周六一周两次皮下注射 0.1 mL 完全佐剂与 pTg 乳化剂, pTg 含量为 100 μg, 分三点: 腹部两点, 颈背部一点皮下注射。后于每周二同一时间腹部、颈背部三点皮下注射不完全佐剂与 pTg 乳化剂, pTg 含量为 100 μg/次, 共注射 4 周。造模期间实验组大鼠饮用高碘水; 空白对照组大鼠喂以普通饲料、饮水, 正常条件下饲养, 与实验组相同时间颈背部、腹部三点皮下注射等量生理盐水。4 周后 20 只大鼠用 1% 戊巴比妥钠溶液麻醉, 麻醉剂量为 4 mg/100 g, 眶静脉取血, 1 mL/只, 血清 4℃ 下以 3000 r/min 离心 15 分钟, 每个标本分装 2 管, 1 管采用酶联免疫吸附法检测血清 TPOAb 水平, 检测造模是否成功, 另一管 -20℃ 冻存备用。造模成功标准: TPOAb 血清滴度

高于60 IU/mL为造模成功大鼠。

1.5 分组及给药

将造模成功大鼠随机分为两组:模型组、阳和汤组,每组各 10 只,空白对照组 10 只,所有大鼠灌胃量均为 1 mL/100 g 大鼠质量。阳和汤组予阳和汤配方颗粒灌胃,按人鼠等效剂量换算(体表面积折算法),每毫升所含生药药量为 0.5 g。模型组及空白对照组予生理盐水灌胃。大鼠每周称重一次,按照体质量给药,三组连续灌胃 6 周。所有大鼠试验期间均在标准环境内合笼饲养,室温 18 ~ 22℃,相对湿度 50%,颗粒饲料自由择食,正常饮水,保持每天光照 14 小时。

1.6 标本的采集与处理

连续灌胃 8 周后,所有大鼠禁食 12 小时,称重,予 1% 戊巴比妥钠 4 mg/100 g 腹腔注射麻醉,打开腹腔,腹主动脉取血,3000 r/min 离心 15 分钟,分离血清,-20℃ 冻存备用。甲状腺组织带临近气管取下,4% 的多聚甲醛液固定,由雪邦技术公司石蜡包埋、切片、HE 染色。

1.7 统计学处理

所有数据采用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组大鼠甲状腺功能、TPOAb、TGAb 及 TPOAb 治疗前后差值进行单因素方差分析;本实验数据方差齐,符合正态分布,采用单因素方差分析,两两比较使用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义,以 $P < 0.01$ 为

差异具有显著统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况

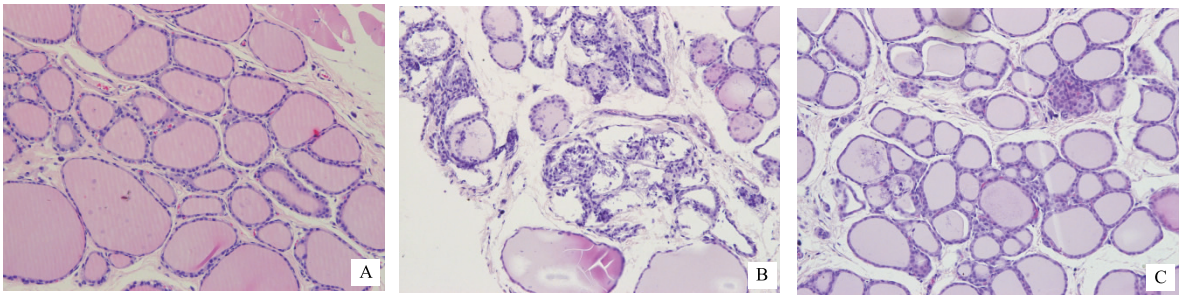
正常组大鼠实验过程中一般状况及进食量良好,行为及体征未见明显变化。部分模型组及中药组大鼠颈背部皮下注射处,可见溃烂,流出黄绿色脓液,脓液流出后 3 ~ 5 天皮肤可愈合,大鼠状态良好。模型组大鼠及中药组大鼠各有一只于造模期间死亡,考虑为造模相关腹腔感染所致。

2.2 对大鼠甲状腺功能及甲状腺自身抗体影响

与正常组大鼠相比,模型组、中药组大鼠促甲状腺激素(TSH)明显降低,血清游离三碘甲腺原氨酸(FT_3)、血清游离甲状腺素(FT_4)明显升高,差异均具有统计学意义($P < 0.01$),模型组与中药组相比,甲状腺功能三项无差异;与正常组大鼠相比,模型组、中药组大鼠 TPOAb、TGAb 明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组相比,中药组大鼠 TPOAb、TGAb 明显降低($P < 0.01$);3 组大鼠 TPOAb 治疗前后差值对比,中药组明显高于正常组及模型组($P < 0.01$)。

2.3 大鼠甲状腺石蜡切片

正常组大鼠甲状腺结构完整,滤泡大小一致,滤泡腔内胞质饱满,滤泡上皮细胞排律较规整,间质内无或仅有少量淋巴细胞,无纤维结缔组织增生。模型组甲状腺滤泡大小不一,滤泡破坏明显,



注:A:正常组;B:模型组;C:中药组

图 1 各组大鼠甲状腺组织石蜡切片 HE 染色($\times 200$)

表 1 各组大鼠甲状腺功能、甲状腺抗体结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FT_3 (pg/mL)	FT_4 (pg/mL)	TSH (uIU/mL)	TGAb (IU/mL)	TPOAb (IU/mL)	TPOAb 治疗前后差值 (IU/mL)
正常组	10	5.2±0.8	20.0±4.8	3.7±0.7	5.9±1.9	6.4±1.7	1.0±1.6
模型组	9	28.5±9.3 ^a	131.0±2.5 ^a	0.2±0.3 ^a	194.0±51 ^a	92.0±14.3 ^a	-2.0±15
中药组	9	26.9±12.0 ^{ab}	124.0±11.0 ^{ab}	0.2±0.2 ^{ab}	81.0±29 ^{ab}	67.0±9.2 ^{ab}	36.0±19.9 ^{ab}

注:与正常组相比,^a $P < 0.01$;与模型组相比,^b $P < 0.01$ 。

甲状腺内完整滤泡个数减少,滤泡腔内胞质减少,80%~100%间质存在淋巴细胞浸润,可见纤维结缔组织增生。中药组滤泡细胞相对较完整,滤泡个数多于模型组,滤泡腔内胞质饱满,30%~50%甲状腺组织存在淋巴细胞浸润,间质少量纤维结缔组织增生。

3 讨论

本实验模型组饲养 8 周后 TPOAb 抗体滴度无下降趋势,提示该方法建立的自身免疫性甲状腺大鼠模型较为稳定。与正常组相比,造模成功大鼠出现甲状腺功能亢进的血清学表现,可进一步研究该模型甲状腺功能的变化与时间曲线,探究该模型后期是否可出现与人类桥本氏病一致的甲状腺功能减退。

阳和汤出自《外科证治全生集》,由熟地黄、肉桂、麻黄、鹿角胶、白芥子、炮姜炭、生甘草七味药组成,为治疗阴疽的名方,具有温阳散寒、活血化瘀、通络散结的功效,现用来治疗肿瘤、甲状腺功能减退、甲状腺结节、慢性淋巴结炎、类风湿性关节炎、妇女乳腺小叶增生、痛经、骨结核等 40 余种疾病的阳虚寒凝证^[11]。研究表明,阳和汤具有调节免疫^[12]、清除过多自由基^[13]和激素样作用^[14]。本研究表明,阳和汤具有降低自身免疫性甲状腺炎大鼠血清抗体及改善甲状腺组织淋巴细胞浸润、保护甲状腺组织的功能,对于甲状腺功能亢进大鼠,使用阳和汤治疗 8 周后对大鼠的甲状腺功能亢进无影响。

自身免疫性甲状腺炎在全球范围内都是常见的甲状腺疾病,自身免疫性甲状腺炎动物模型现已被广泛应用于动物实验^[15],而自 T 淋巴细胞免疫失调被认为是自身免疫性甲状腺炎的导致甲状腺病理损伤的主要因素^[16]。目前,自身免疫性甲状腺炎较为一致的认识是本病的发生与遗传因素和环境因素综合作用相关,免疫、炎症、氧化应激、凋亡等与本病的病情发展密切相关。免疫学研究表明,HT 主要是由 T 细胞介导的自身免疫性疾病,甲状腺维持自身耐受的能力受损,无法抑制自身抗原的免疫应答,从而导致甲状腺细胞对自身的过度免疫。现代研究表明,AT 的免疫失调与 Th1/Th2 平衡偏移相关,Th1 免疫亢进,引起以细胞免疫为主的甲状腺病理损伤。同样,Th17/Treg 的平衡偏移同样影响甲状腺的自身免疫反应。研究发现,在 HT 患者中 IL-17 过表达,其水平与 TgAb 及 TPOAb 呈正相关^[17],提示 Th17 细胞及其炎性细胞因子可能参与甲状腺组织的破坏。阳和汤是

否通过调节 T 淋巴细胞亚群平衡,改善甲状腺自身免疫,尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 茹志成,李国斌. 甲状腺内注射地塞米松磷酸钠联合口服左旋甲状腺素钠治疗伴亚临床甲减的桥本甲状腺炎疗效观察[J]. 当代医学,2012,18(16):140-141.
- [2] 徐宏旦. 桥本甲状腺炎地塞米松局部免疫治疗的临床疗效分析[J]. 中国现代药物应用,2016,10(5):137-138.
- [3] 刘艳桥,魏军平,杨洪军. 甲状腺中西医结合治疗学[M]. 北京:科学技术文献出版社,2012:237-353.
- [4] 牛瑞芳,张春玲,翟亚萍,等. 雷公藤多苷短程治疗对桥本病甲状腺组织 T 细胞亚群的影响[J]. 山东大学学报:医学版,2014,52(3):86-89.
- [5] 许琪,蔡春花,陈慎仁. 小剂量甲氨蝶呤治疗高甲状腺过氧化物酶抗体血症观察[J]. 药物流行病学杂志,2013,(8):410-412.
- [6] 吕飞娟,杨燕玲,许景生,等. 亚硒酸钠治疗桥本甲状腺炎的临床观察[J]. 临床军医杂志,2013,41(1):35-36.
- [7] 张薇,王俊芳,李京丽,等. 硒对桥本甲状腺炎患者 TPOAb 及 TGAb 水平的影响[J]. 中国医学创新,2013,10(14):13-14.
- [8] 赵岚,王玲,付兵权. 骨化三醇在桥本甲状腺炎并甲状腺功能减退患者中的临床应用分析[J]. 医学综述,2016,22(12):2410-2412.
- [9] 王丹,赵勇,左新河. 中医药治疗自身免疫性甲状腺炎的研究进展[J]. 江西中医药,2016,47(7):75-77.
- [10] 穆耕林. 温阳化痰法治疗自身免疫性甲状腺炎的实验研究[D]. 南京:南京中医药大学,1992.
- [11] 王丹,邹国明,湛莉媚,等. 喻文球临床新用阳和汤医案 5 则[J]. 江西中医药大学学报,2016,28(5):29-32.
- [12] 罗艳,楼丽华,沃兴德,等. 阳和汤对急性乳腺炎患者的疗效及 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 中华中医药学刊,2013,(5):1069-1070.
- [13] Estrada-García L, Carrera-Rotllan J, Puig-Parellada P. Effects of oxidative stress and antioxidant treatments on eicosanoid synthesis and lipid peroxidation in long term human umbilical vein endothelial cells culture [J]. Prostaglandins & Other Lipid Mediators,2002,67(1):13-25.
- [14] 张明发,沈雅琴. 甘草及其活性成分抗炎与抗炎机制的研究进展[J]. 现代药物与临床,2011,26(4):261-268.
- [15] Burek C L, Talor M V. Environmental triggers of autoimmune thyroiditis. [J]. Journal of Autoimmunity, 2009, 33 (3-4): 183-189.
- [16] Gopalakrishnan S, Sen S, Adhikari J S, et al. The role of T-lymphocyte subsets and interleukin-5 blood levels among Indian subjects with autoimmune thyroid disease. [J]. Hormones,2010, 9(1):76-81.
- [17] 陈紫君,刘纯,李强,等. Th17 细胞及相关细胞因子在自身免疫性甲状腺疾病中的变化及意义[J]. 免疫学杂志,2011,(9):785-788.

(收稿日期:2016-11-13)

(本文编辑:董历华)