

论著·基础研究

夏枯草对 AIT 大鼠 TSH、TGAb、TPOAb 及 Th 相关细胞因子表达的调节作用研究*

余欣然¹, 向楠^{2△}

(湖北省中医药大学:1. 中医临床学院;2. 第一临床医学院, 武汉 430000)

摘要:目的 通过研究夏枯草对自身免疫性甲状腺炎(AIT)大鼠促甲状腺激素(TSH)、甲状腺球蛋白抗体(TGAb)与甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)及辅助性 T 细胞(Th)相关细胞因子 γ -干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 4(IL-4)、白细胞介素 17(IL-17)的调节作用,探讨夏枯草的作用机制,为临床运用提供理论基础。**方法** 将 40 只 4~6 周雌性 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、西药对照组(硒酵母组)、夏枯草组。每组各 10 只,空白组予以常规饲养,模型及药物组大鼠予以猪甲状腺球蛋白(PTg)注射及高碘水喂养造模,造模后药物组大鼠分别予以硒酵母及夏枯草的生理水溶液灌胃,干预 6 周后处死大鼠,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测各组大鼠血清 TSH、TGAb、TPOAb、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-17 水平。**结果** 模型组大鼠 TSH、TGAb、TPOAb、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-17 水平较空白组显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。硒酵母组与夏枯草组 TSH、TGAb、TPOAb、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-17 水平均低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);夏枯草组 TSH、IFN- γ 、IL-4、IL-17 水平均低于硒酵母组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 夏枯草可以降低 AIT 大鼠 TSH、自身抗体及 Th 相关细胞因子的表达,具有免疫调节作用,值得在临床推广运用。

关键词:自身免疫性甲状腺炎; 夏枯草; 细胞因子**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.13.003**中图法分类号:**R581.4**文章编号:**1673-4130(2018)13-1543-04**文献标识码:**A

Explore the effect of *Prunella vulgaris* on TSH, TGAb, TPOAb and Th cell-related cytokine expression in AIT rats*

YU Xinran¹, XIANG Nan^{2△}

(1. Traditional Chinese Medicine Clinical College; 2. The First Clinical Medical College, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430000, China)

Abstract: Objective To study and explore the effect of *Prunella vulgaris* on TSH, TGAb, TPOAb and Th cell-associated cytokines IFN- γ , TNF- α , IL-4 and IL-17 in autoimmune thyroiditis (AIT) rats. **Methods** Divide forty female Sprague-Dawley rats into four group: blank group, model group, western medicine control group (selenium yeast group), *Prunella vulgaris* group, 10 rats in each group, The rats in the model group and the rats in the model group were treated with PTg injection and high iodine water. The rats in the drug group were treated with sour yeast and *Prunella vulgaris*. The rats were sacrificed 6 weeks after the intervention. Elisa method was used to detect the rats Serum levels of TSH, TGAb, TPOAb and IFN- γ , TNF- α , IL-4 and IL-17 were measured. **Results** The levels of TSH, TGAb, TPOAb, IFN- γ , TNF- α , IL-4 and IL-17 in the model group were significantly higher than those in the blank group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Selenium yeast group and *Prunella vulgaris* group TSH, TGAb, TPOAb, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-17 were lower than the model group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); The levels of TSH, IFN- γ , IL-4 and IL-17 in *Prunella vulgaris* group were lower than those in selenium yeast group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** *Prunella vulgaris* can reduce the expression of autoantibodies and Th-related cytokines in AIT rats, and have immunomodulatory effects, it is worth to promote the use of clinical.

* 基金项目: 国家中医药管理局第一批全国中医学学术流派传承工作室建设项目(国中医药办人教函[2012]170)。

作者简介: 余欣然, 女, 博士在读, 主要从事中医药防治内分泌及代谢性疾病研究。△ 通信作者, E-mail: 3195686707@qq.com。

本文引用格式: 余欣然, 向楠. 夏枯草对 AIT 大鼠 TSH、TGAb、TPOAb 及 Th 相关细胞因子表达的调节作用研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(13): 1543-1546.

Key words: autoimmune thyroiditis; *Prunella vulgaris*; cytokines

自身免疫性甲状腺炎(AIT)是一种自身免疫性疾病,以慢性淋巴性甲状腺炎(又称桥本氏甲状腺炎)最为多见,其特征性改变为甲状腺球蛋白抗体(TGAb)与甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)显著升高,促甲状腺激素(TSH)可升高或降低。国外统计其发病率可达 5%^[1],国内流行病学统计本发病率为 0.3%~10%。AIT 的发病机制尚不明确,因此目前无确切有效的治疗方法,对已经发生甲状腺功能减退症(简称甲减)的患者可以给予甲状腺激素替代治疗^[2],有研究发现补硒可以抑制 AIT 的发生^[3]。现代医学在理论上提出针对其免疫因素采用免疫调节剂进行治疗,然而因药物毒副作用产生一定争议。研究表明,辅助性 T 细胞(Th)功能失衡与 AIT 的发生有着密切的关系^[4],而 Th 的功能是通过 γ -干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 4(IL-4)、白细胞介素 17(IL-17)等一系列相关细胞因子实现的,本文以 AIT 模型 SD 大鼠为研究对象,以 TSH、TGAb、TPOAb 水平评价模型建立及疗效,着重探讨夏枯草对 AIT Th 相关细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-17 水平的影响,分析夏枯草对 AIT 模型鼠的作用机制,为临床运用提供理论支持。

1 材料与方

1.1 材料 选择 2016 年 6—9 月清洁级 4~6 周,体质量 100~120 g 的雌性 SD 大鼠 40 只,由湖北省疾病预防控制中心提供,饲养于湖北中医药大学实验动物中心清洁级动物房中,常规饲料及蒸馏水喂养,适应性饲养 1 周后开始实验。

1.2 仪器与试剂 硒酵母片(西维尔)由牡丹江灵泰药业有限公司提供,批号为国药准字 H10940161,规格:50 μ g;夏枯草胶囊由北京紫辰宣医药经营有限公司提供,批号为国药准字 Z19991033,规格:每粒装 0.35 g;大鼠 TSH、TGAb、TPOAb、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-17 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒由武汉基因美生物科技有限公司提供,批号 201611。

1.3 方法

1.3.1 分组与造模 适养性饲养 1 周后按照随机数表法随机编号分为 4 组,即空白组、模型组、西药对照组(硒酵母组)、夏枯草组。取猪甲状腺球蛋白(PTg)与完全弗氏佐剂(CFA)与等体积混合充分乳化,取除空白组外大鼠,于足垫背部皮下多点注射 PTg 每只 100 μ g,进行初次免疫。每周 1 次,连续 2 周,第 3 周后取 PTg 与 CFA 等体积混合充分乳化,在大鼠四肢内侧及背部皮下多点注射,每周加强 1 次至第 6 周结束,并给予碘化钠高碘水喂养。实验结束后检测模型组大鼠 TSH 及 TGAb、TPOAb 水平显著高于空白

组,符合 AIT 诊断,证实造模成功。

1.3.2 给药方法 给药剂量按照人服用最大剂量的人和 大鼠体表面积换算,硒酵母片每 40 片碾碎溶于 100 mL 生理盐水,配制成 20 μ g/mL 的硒酵母溶液,按每天 1 mL/100 g 剂量给硒酵母组各大鼠灌服。夏枯草胶囊使用时去外胶囊,将药粉末每 14 粒溶于 100 mL 生理盐水,配制成 50 mg/mL 的夏枯草溶液,按照每天 1 mL/100 g 剂量给夏枯草组各大鼠灌胃,空白组及模型组按照 1 mL/100 g 体质量灌服生理盐水,各组连续药物干预 6 周。

1.3.3 检测方法 最后一次干预后,大鼠禁食 12 h,10%水合氯醛麻醉后心脏取血 5 mL 置于无抗凝剂的采血管中,用记号笔标记大鼠组别,室温静置 2 h 后,以 2 000 r/min 离心 10 min,取上层血清。采用 ELISA,按照试剂盒说明操作,根据各浓度标准品 OD 值在该曲线图上查出相应血清样本 TSH、TGAb、TPOAb、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-17 水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 分析软件,采用 Kolmogorov-Smirnov 检验法(KS 检验)检验数据的正态性,组间比较用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正态性检验 各变量进行正态性检验(KS 检验),结果见表 1,所有变量均为正态分布。

表 1 各变量 KS 检验比较

统计值	TSH	TGAb	TPOAb	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-17
<i>t</i>	0.130	0.087	0.083	0.063	0.093	0.115	0.116
<i>P</i>	0.086	0.200	0.200	0.200	0.200	0.196	0.192

2.2 各组大鼠血清 TSH、TGAb、TPOAb 水平比较 见表 2。模型组大鼠 TSH、TGAb、TPOAb 水平均显著高于空白组,药物干预后水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);夏枯草组 TSH 水平低于硒酵母组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。表明夏枯草可以显著降低 AIT 大鼠 TSH、TGAb、TPOAb 水平,且与硒酵母相对比,在降低 TSH 上更具优势。

2.3 各组大鼠血清细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-17 水平比较 见表 3。模型组大鼠血清 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-17 水平均高于空白组,药物干预后水平均明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);夏枯草组 IFN- γ 、IL-4、IL-17 水平均低于硒酵母组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。表明夏枯草有下调 Th 相关细胞因子表达的作用,且与硒酵母相比,在降低 IFN- γ 、IL-4、IL-17 水平上更具优势。

表 2 各组大鼠血清 TSH、TGAb、TPOAb 水平比较($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	TSH	TGAb	TPOAb
空白组	10	1 956.87 ± 198.45	229.89 ± 20.16	2 390.50 ± 256.83
模型组	10	4 086.90 ± 193.37*	570.97 ± 28.02*	4 813.85 ± 219.36*
硒酵母组	10	3 146.75 ± 226.94*#	390.01 ± 39.26*#	3 336.73 ± 127.84*#
夏枯草组	10	2 664.66 ± 239.90*#▲	391.81 ± 48.78*#	3 585.68 ± 141.52*#▲
F		172.07	151.95	264.73
P		0.00	0.00	0.00

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$;与硒酵母组比较,▲ $P < 0.05$

表 3 各组大鼠血清细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-17 水平比较($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-17
空白组	10	125.96 ± 13.45	168.07 ± 29.91	130.77 ± 9.00	35.77 ± 14.26
模型组	10	338.39 ± 7.17*	324.35 ± 15.03*	319.21 ± 21.81*	252.75 ± 15.73*
硒酵母组	10	207.65 ± 18.97*#	228.89 ± 8.05*#	208.35 ± 8.80*#	176.38 ± 12.97*#
夏枯草组	10	187.05 ± 11.17*#▲	252.97 ± 13.97*#▲	185.32 ± 18.54*#▲	202.89 ± 18.18*#▲
F		446.08	120.99	256.537	101.32
P		0.00	0.00	0.00	0.00

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$;与硒酵母组比较,▲ $P < 0.05$

3 讨 论

夏枯草为唇形科夏枯草属植物,具有降压、降血糖、抗病毒、抗过敏、抗炎、抗肿瘤和免疫调节作用,对特异性及非特异性免疫炎症均有抑制作用^[5]。在前期研究中,大量临床试验已证明可以降低患者 TSH、TGAb、TPOAb 滴度,与本实验研究结果相一致。且与常用的西药硒酵母相对比,在降低 TSH 上更具优势。提示在治疗桥本氏甲状腺炎甲减状态时,加用夏枯草可以更好更快的改善患者的临床症状,且成分安全稳定,利于患者长期应用。

近年来,诸多学者从 T 细胞介导的免疫反应来探讨 AIT 的发病机制,研究认为 AIT 是始于对甲状腺抗原特异性的 CD4⁺ T 辅助细胞(Th)的激活^[6-7]。本研究选取了具有代表性的 Th 相关细胞因子来衡量 Th 功能,从本实验可以看出,AIT 模型大鼠 Th 相关细胞因子水平显著增加。Th 细胞包括 Th1、Th2、Th17 细胞等,Th1 主要介导细胞免疫,且认为其功能与桥本氏甲状腺炎患者严重程度相关,重度桥本氏甲状腺炎患者的 Th1 细胞多于轻度患者^[8]。Th1 细胞在细胞应答下分泌 IFN- γ 、TNF- α ,由 1 型反应介导的甲状腺组织破坏,在启动适应性免疫应答中起重要作用^[9]。IFN- γ 可诱导主要组织相容性复合体(MHC)类分子表达,促进抗原呈递过程,同时促进 T 细胞和 B 细胞分化,增强免疫反应,激活巨噬细胞。TNF- α 过多分泌可增强 IFN- γ 诱导甲状腺滤泡上皮细胞人类白细胞抗原 II (HLA II) 抗原的产生,导致甲状腺自身免疫性损害。此外,IFN- γ 、TNF- α 还有诱导免疫酶体的作用,而免疫酶体在 T 细胞扩增,细胞因子产生

和 T 辅助细胞分化中起关键作用^[10]。Th2 可分泌 IL-4、IL-6、IL-10 等细胞因子,主要介导体液免疫。IL-4 可诱导 B 淋巴细胞增殖、分化和成熟,促使其产生 IgE 和 IgG 等抗体。同时,在特定条件下,IL-4 受 CD8⁺ T 细胞分化而来的 Tc2 亚型的驱动,在抗原特异性 Th2 应答中起关键作用,可以应激损伤甲状腺细胞^[11-12]。Th17 细胞主要合成 IL-17,IL-17 通过诱导炎症介质、趋化因子等导致组织器官的炎性损伤,已被鉴定为 AIT 中的另外的参与者。大量研究发现桥本氏甲状腺炎患者血清中炎性细胞因子 IL-17 高于空白组,且与血清 TPOAb 滴度呈正相关^[13]。有研究显示^[14],夏枯草可降低 AIT 患者 Th17 水平,与本实验研究一致。有研究认为^[15],桥本氏甲状腺炎患者以 Th1 免疫占优势,慢性甲状腺肿伴甲状腺功能亢进患者以 Th2 免疫占优势。本研究中发现 AIT 大鼠模型 Th1 相关的 IFN- γ 、TNF- α 和 Th2 相关的 IL-4 细胞因子均有显著升高,提示二者均参与到了 AIT 的发生发展,但本研究只选取了部分相关细胞因子,二者失衡关系并不能明确分析,有待做流式细胞等进一步检测。

4 结 论

综上所述,AIT 的发生是一种免疫平衡的破坏,与 Th 相关细胞因子的高表达密切相关,从实验结果中可以看出,夏枯草对于 Th1 相关的细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 、Th2 相关细胞因子 IL-4、Th17 相关细胞因子 IL-17 均有不同程度的抑制作用。且与硒酵母相比,在降低 IFN- γ 、IL-4、IL-17 水平上更具优势,提示其可以通过抑制 Th 细胞相关的免疫应答作用,减少

相关细胞因子对甲状腺的损伤,值得在临床上推广运用。

参考文献

- [1] ANTONELLI A, FERRARI S M, CORRADO A, et al. Autoimmune thyroid disorders [J]. *Autoimmun Rev*, 2015, 14 (2):174-180.
- [2] 李玉姝, 单忠艳. 自身免疫性甲状腺疾病的诊断和治疗 [J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2012, 32(3):155-157.
- [3] WANG W, XUE H, LI Y. Effects of selenium supplementation on spontaneous autoimmune thyroiditis in NOD. H-2h4 mice [J]. *Thyroid*, 2015, 25(10):1137-1144.
- [4] 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):1160-1163.
- [5] 窦景云, 于俊生. 夏枯草药理作用及临床应用研究进展 [J]. *现代医药卫生*, 2013, 31(7):1039-1041.
- [6] KHAN FA, ALJAMEIL N, KHAN M F, et al. Thyroid dysfunction: an autoimmune aspect [J]. *Inter J Clin Exp Med*, 2015, 8(5):6677-6681.
- [7] 马倩倩, 于世鹏. CD4⁺ T 淋巴细胞与桥本氏甲状腺炎 [J]. *济宁医学院学报*, 2015, 38(6):434-437.
- [8] NANBA T, WATANABE M, INOUE N, et al. Increases of the Th1/Th2 cell ratio in severe Hashimoto's disease and in the proportion of Th17 cells in intractable Graves' disease [J]. *Thyroid*, 2009, 19(5):495-501.
- [9] PYZIK A, GRYWALSKA E, MATYJASZEK-MATUSZEK

B, et al. Immune disorders in Hashimoto's thyroiditis: what do we know so far [J]. *Immunol Res*, 2015; 97(9):167-175.

- [10] BASLER M, MUNDT S, BITZER A, et al. The immunoproteasome: a novel drug target for autoimmune diseases [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2015, 33(4):74-79.
- [11] LIANG Y, PAN H F, YE D Q. IL-17A-producing CD8 (+) T cells as therapeutic targets in autoimmunity [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2015, 19(5):651-661.
- [12] RAAD H, ESKALLI Z, CORVILAIN B, et al. Thyroid hydrogen peroxide production is enhanced by the Th2 cytokines, IL-4 and IL-13, through increased expression of the dual oxidase 2 and its maturation factor DUOX2 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 56(3):216-225.
- [13] FIGUEROA-VEGA N, ALFONSO-PEREZ M, BENEDICTO I, et al. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and Th17 lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(2):953-962.
- [14] 薛磊. 优甲乐联合夏枯草胶囊对桥本甲状腺炎患者自身抗体及 Th17 细胞的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(14):4053-4054.
- [15] 黎亮, 许杰艺. 细胞因子 Th1/Th2 失衡在 AITD 发病中的作用 [J]. *中国现代普通外科进展*, 2016, 19(10):801-802.

(收稿日期:2017-11-20 修回日期:2018-02-19)

(上接第 1542 页)

体化的给药,从而减少不良反应,也有利于药企针对 CYP2D6 开发新的药物,为人类的健康带来福音。

参考文献

- [1] EICHELBAUM M, INGELMAN-SUNDBERG M, EVANS W E. Pharmacogenomics and individualized drug therapy [J]. *Annu Rev Med*, 2006, 57(1):119-137.
- [2] ZANGER U M, RAIMUNDO S, EICHELBAUM M. Cytochrome P4502D6: Overview and update on Pharmacology, genetics, biochemistry [J]. *Naunyn-Schönbein Arch Pharmacol*, 2004, 369(1):23-37.
- [3] INGELMAN-SUNDBERG M, SIM S C, GOMEZ A, et al. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects [J]. *Pharmacol Ther*, 2007, 116(3):496-526.
- [4] JIN Y, DESTA Z, STEAMS V, et al. CYP2D6 genotype antidepressant use and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97(1):30-39.
- [5] 徐田雪, 杨信怡, 赵昆, 等. 药物代谢酶细胞色素 P4502D6 的遗传多态性研究进展 [J]. *中国抗生素杂志*, 2009, 34(7):385-391.
- [6] BENNY K, ADITHAN C. Genetic polymorphism of CYP2D6 [J]. *Indian J Pharmacol*, 2001, 33(1):147-169.

- [7] SISTONEN J, SAJANTILA A, LAO O, et al. CYP2D6 worldwide genetic variation shows high frequency of altered activity variants and no continental structure [J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2007, 17(2):93-101.
- [8] DE JONGE H, NAESSENS M, KUYPERS D R. New insights into the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the calcineurin inhibitors and mycophenolic acid: possible consequences for therapeutic drug monitoring in solid organ transplantation [J]. *Ther Drug Monit*, 2009, 31(4):416-435.
- [9] 成碟, 徐为人, 刘昌孝. 细胞色素 P450(CYP450) 遗传多态性研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(12):1409-1414.
- [10] 付良青, 吴德政. 细胞色素 P4502D6 的研究进展 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2000, 16(6):453-457.
- [11] 蔡卫民, 陈冰, 陶欣, 等. 细胞色素 P4502D6 酶基因多态性与右美沙芬氧化代谢相关研究 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2000, 17(3):181-184.
- [12] 雷霆雯, 许庆忠, 吴宁, 等. 中国苗族 CYP2D6 * 10B 基因多态性研究 [J]. *中国公共卫生*, 2004, 20(4):439-440.
- [13] 杨业华, 马正强, 张天真, 等. 普通遗传学 [M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2006:307-310.

(收稿日期:2017-11-22 修回日期:2018-02-26)