

温肾方对小鼠自身免疫性甲状腺炎治疗作用的实验研究

余江毅*

摘要 目的:研究温肾方对自身免疫性甲状腺炎模型(EAT)免疫调节作用的药理机制。方法:采用随机平行对照法观测各组细胞免疫、体液免疫及病理学变化。结果:温肾方可显著抑制 EAT 模型甲状腺球蛋白抗体(TGAb)、 β 细胞膜表面免疫球蛋白(SmIg)水平($P<0.01$),升高 T 细胞水平($P<0.01$),显著抑制甲状腺滤泡淋巴细胞浸润($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:温肾方可减轻甲状腺自身免疫性炎症,改善甲状腺功能。

主题词 甲状腺炎,自身免疫性/中医药疗法 @ 温肾方

人类自身免疫性甲状腺炎是甲状腺功能减退(简称甲减)最常见的病因,甲状腺组织以淋巴细胞浸润为主,随着自身免疫性炎症的进展,甲状腺滤泡组织不断破坏,其自然病程向甲减发展。出现甲减时,可有怕冷、乏力、粘液性水肿、贫血、面色苍白、月经过多等肾元亏虚表现,温肾方治疗本病有良好的临床效果。本研究拟探讨该药免疫调节作用的药理机制。

1 材料

1.1 动物:雌性 2 周龄纯系昆明小鼠 50 只,由江苏省实验动物中心提供。

1.2 药物:温肾方浸膏(组成:淫羊藿 10g,麻黄 6g,防己 10g,补骨脂 10g。每毫升含生药 2.0g,江苏省中医院制剂部提供,批号:991205)。麻黄浸膏:单味麻黄去除麻黄碱后制成浸膏,每毫升含生药 2.5g。丹参煎液每毫升含生药 2.1g。

2 方法

2.1 动物造模及分组

2.1.1 自身免疫性甲状腺炎模型(EAT)的制备(Weetman 法)^[1]:抗原——小鼠甲状腺球蛋白(TG)的制备:小鼠甲状腺匀浆用异硫氨酸胍匀浆缓冲液法,并经盐析, Sephadex 凝胶过滤、层析、PBS 洗脱。将洗脱液测吸光度,收集第一峰洗脱液,即得 TG 粗制品。

绵羊红细胞(SRBC)-TG 制备:(1)绵羊血,由江苏省农业科学院提供;(2)SRBC 以 0.9%NaCl 反复洗,离心,弃上清液而得;(3)SRBC-TG:用鞣酸将本实验制备 TG 标记在 SRBC 上即得。

造模方法:以弗氏佐剂-TG 抗原(1:1)乳化剂分 5 次于小鼠双后足垫、背部、颈部、腿部多点皮下或肌肉注射免疫。

2.1.2 实验分组:所有动物造模第 34 天随机分为空白对照组、模型对照组、丹参组、麻黄组、温肾方组 5 组,每组 10 只,给药组于第 35 天分别灌胃给予温肾方浸膏(含生药 2.0g/ml)、麻黄浸膏(2.5g/ml)、丹参煎液(2.1g/ml)各 0.2ml。

各组动物均喂养颗粒饲料,全部动物于第 12 周末处死,尸检取甲状腺。

2.2 观察指标及方法

2.2.1 甲状腺球蛋白抗体(TGAb):RIA 法。

2.2.2 B 细胞膜表面免疫球蛋白(SmIg):异硫氰酸荧光抗体染色法。

2.2.3 T 细胞亚群:OKT₃、OKT₄、OKT₈ 单克隆抗体由卫生部武汉生物制品研究所提供。

2.2.4 甲状腺组织学检查:光镜:组织标本用 HE 染色;电镜:观察上皮细胞亚微结构。

2.3 统计学方法:多组比较 F 检验,两两比较 q 检验。

3 结果

3.1 免疫学检查情况

3.1.1 血清 TGAb、SmIg:中药丹参、麻黄、温肾方均可显著抑制 EAT 模型 TGAb、SmIg,而以温肾方抑制作用最强,且显著优于丹参对照组及麻黄对照组($P<0.01$),见表 1。

3.1.2 T 淋巴细胞亚群变化:温肾方组可显著提高 EAT 模型 CD₃、CD₄、CD₈ 水平($P<0.01$),见表 2。

3.2 病理形态学检查

3.2.1 光镜检查:HE 染色,模型对照组小鼠甲状腺均有明显的淋巴细胞浸润,嗜酸性细胞(Asknaxy)浸润达 7.36,符合 EAT 模型改变。温肾方组可显著抑

表 1 各组 TGAb、SmIg 测定值比较($\bar{X} \pm s$)

组别	鼠数	TGAb(U/ml)	SmIg(%)
空白对照组	10	18±23	13.10±1.91
模型对照组	10	338±98	36.20±2.53
丹参对照组	10	164±78 [△]	22.40±4.27 [*]
麻黄对照组	10	108±69 [△]	21.30±2.63 [*]
温肾方组	10	53±45 ^{**}	18.42±3.37 ^{**}

与模型对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与温肾方组比较, $\Delta P<0.01$

基金项目:江苏省“333 工程”人才基金资助课题[苏卫人(2000)5 号]

* 南京中医药大学附属医院内分泌科,南京市汉中 155 号

(210029)

收稿日期:2002-07-10;修回日期:2002-10-08

表2 各组 T 细胞亚群变比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CD ₃	CD ₄	CD ₈
空白对照组	10	28.7±1.48	22.8±0.61	12.6±0.32
模型对照组	10	23.1±1.50	18.1±0.79	11.6±0.61
丹参对照组	10	27.8±1.42	21.1±0.62	11.8±0.70
麻黄对照组	10	27.5±1.20	20.6±0.72	11.2±0.73 [△]
温肾方组	10	28.6±1.32 [*]	20.9±0.91 [*]	12.7±0.42 [*]

与模型对照组比较, * $P < 0.01$; 与温肾方组比较, $\Delta P < 0.01$

表3 各组小鼠甲状腺病理学改变

组别	间质间隔增宽 (病变小鼠%)	淋巴细胞浸润 (病变小鼠%)	Askanaxy 细胞 (平均每只%)	灶性病变总数	C 纤维性病变 (小鼠%)
模型对照组	100	100	7.36	4	57.1
温肾方组	100	2.5	3.12	1	36.7
麻黄对照组	100	66.7	4.01	2	50.0
丹参对照组	100	100	8.55	4	62.5

表4 电镜下各组滤泡上皮亚微结构基本变化

组别	上皮微绒毛	粗面内质网	线粒体	胞膜形态
空白对照组	较多	形态正常	形态正常	完整
模型对照组	脱落	管腔闭塞	形态不规则	多呈碎裂
丹参对照组	部分脱落	减少	形态不规则	迂曲内陷
麻黄对照组	部分脱落	发达	增多增大	基本完整
温肾方组	稀疏	发达	较多	基本正常

制 EAT 模型甲状腺淋巴细胞浸润及 Askanaxy 细胞浸润($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 见表 3。

3.2.2 电镜检查: DXA1-10 型电镜观察, 温肾方组甲状腺滤泡上皮亚微结构基本正常, 见表 4。

4 讨论

自身免疫性甲状腺炎又称桥本氏病(HT), 是一种原发性器官特异性自身免疫性疾病, 多见于中年妇女。HT 发病过程多为具有特定遗传素质的个体, 在环境、精神因素作用下, 引起细胞免疫及体液免疫功能紊乱, 主要是抑制性 T 细胞(T_s)功能特异性缺陷, 辅助性 T 细胞(T_H)功能相对增加, 诱发抗体依赖、细胞介导的细胞毒作用(ADCC)^[2-4]。HT 的基本病理改变为甲状腺组织内有大量淋巴细胞浸润, 甲状腺组织有显著破坏现象。本实验用弗氏佐剂-TG 抗原造成的 EAT 模型, 其甲状腺病理学及外周 T 细胞亚群变化均类似于人类自身免疫性甲状腺炎, 是观察药物干预作用的公认模型之一。TGAb 与甲状腺球蛋白结合后, 可通过 Fc 受体与结合抗体的相互作用激活 NK 细胞而攻击靶细胞, 导致甲状腺细胞破坏即所谓抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(ADCC), 故可见 TGAb、SmIg 显著升高, 淋巴细胞及嗜酸性细胞浸润, ADCC 可能是本模型的主要形成机制^[1,5]。

温肾方针对自身免疫性甲状腺炎阳气虚弱、痰瘀

凝聚的病机, 以温肾壮阳、行气破瘀为治法。方中淫羊藿补肾壮阳, 行血散寒, 为君药; 麻黄辛温达卫, 宣通经络, 并引阳气, 开瘀结, 故为臣; 佐以防己辛散降泄, “散留痰, 开结气”; 补骨脂性温助阳, 补肾强腰。四药合用, 既可使气血宣通, 又可化痰散结, 临床治疗 HT 甲减有显著改善甲状腺功能, 使 TGAb、TMAb 下降的作用。本实验显示, 该方可明显降低小鼠 TGAb、SmIg 滴度, 升高 T 细胞亚群 CD₃、CD₄ 又称 T_s, 自身免疫性甲状腺炎时, CD₃ 功能不足, 诱发抗体依赖, 细胞介导的细胞毒作用是其主要发病机理。

参考文献

- 1 Weetman AP, McGregor AM. Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. *Endocr Rev*, 1994, 15(6): 788-830.
- 2 Ajan RA, Weetman AP. Pathogenesis of autoimmune thyroid disease. In: Paul S(edit). *Contemporary immunology: Autoimmune reactions*, Humana Press Inc. Totowa, NJ. 1999; 31-59.
- 3 李健, 高慧, 苏敏. 自身免疫性甲状腺病甲状腺浸润细胞亚群的观察. *中华内分泌代谢杂志*, 1994, 10(2): 92.
- 4 Takasu N, Komiya I, Asawa T, et al. Test for recovery from hypothyroidism during thyroxine therapy in Hashimoto's thyroiditis. *Lancet*, 1990, 33(8723): 1084-1086.
- 5 杜培宜, 黄北春, 裴学菊, 等. 自身免疫性甲状腺疾病细胞学变化与自身抗体及临床转归的关系. *中华内分泌代谢杂志*, 1995, 11(3): 150-153.