

人参皂苷对实验性自身免疫性甲状腺炎大鼠 Th1/Th2 相关细胞因子的影响

黄琦* 冯晓红 张寅晓 赵闫丽 苗青 林筱洁

(浙江中医药大学附属第一医院, 杭州市邮电路 54 号, 310006)

基金项目: 浙江省科技厅项目(2012C33007); 浙江省中医药科技计划项目(2012ZA035)

* 通讯作者: hq5533@hotmail.com, 18957118388

[摘要] 目的 探讨人参皂苷对实验性自身免疫性甲状腺炎(EAT)大鼠的可能作用机制。方法 将 40 只 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组和人参皂苷低、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(PTg)与弗氏完全佐剂(CFA)和弗氏不完全佐剂(IFA)皮下注射 6 周诱导 EAT 动物模型的建立。造模后人参皂苷低、中、高剂量组分别给予人参皂苷 14 mg/kg、28 mg/kg、56 mg/kg 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 水平有明显升高, IL-4 水平明显降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 人参皂苷低、中剂量组均可降低 TGAb、TPOAb 水平, 升高 IL-4 水平($P < 0.05$)。结论 人参皂苷能降低甲状腺自身抗体, 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] 人参皂苷; 自身免疫性甲状腺炎; 桥本甲状腺炎; 细胞因子

Effect of Ginsenosides on Th1/Th2-Related Cytokines in Rats with Experimental Autoimmune Thyroiditis

HUANG Qi, FENG Xiaohong, ZHANG Yinxiao, ZHAO Yanli, MIAO Qing, LIN Xiaojie

(The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang Province 310006)

ABSTRACT **Objective** To study the possible mechanism of ginsenosides in regulating Th1/Th2 in rats with experimental autoimmune thyroiditis (EAT). **Methods** Forty Wistar rats were randomized into the normal group, model group, low-dose group, middle-dose group, and high-dose group, with 8 in each. The EAT models were established by subcutaneously injecting porcine thyroglobulin (PTg), Freund's complete adjuvant (CFA) and incomplete Freund's adjuvant (IFA) for 6 weeks in all groups except the normal group. The low-dose group, middle-dose group and high-dose group was gavaged with 14mg/kg, 28 mg/kg and 56 mg/kg of ginsenosides respectively for 8 weeks. The normal group and model group were given equal amount of distilled water. The expressions of thyroglobulin antibody (TGAb), thyroid peroxidase antibody (TPOAb), interleukin-2 (IL-2) and IL-4 were detected in all groups. **Results** Comparing with the normal group, the levels of TGAb, TPOAb and IL-2 were significantly increased but the IL-4 level was significantly decreased in the model group ($P < 0.01$). Comparing with the model group, the levels of TGAb and TPOAb were significantly decreased but the IL-4 level was significantly increased in the low-dose group and middle-dose group ($P < 0.05$). **Conclusion** Ginsenosides can reduce thyroid autoantibodies, and its mechanism may be relevant to reducing the expression of IL-2, increasing the expression of IL-4 and regulating the Th1/Th2 imbalance.

Keywords ginsenosides; experimental autoimmune thyroiditis; Hashimoto's thyroiditis; cytokine

桥本甲状腺炎(hashimoto's thyroiditis, HT)又称自身免疫性甲状腺炎(autoimmune thyroiditis, AIT),是一种器官特异性自身免疫疾病,以体内生成特异性甲状腺自身抗体和甲状腺组织大量淋巴细胞浸润为特征^[1],最后导致甲状腺组织结构破坏和甲状腺功能低下。甲状腺自身抗体属破坏性抗体,HT患者血清中甲状腺球蛋白抗体(TGAb)、甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)等一系列抗体释放的原因与甲状腺自身免疫反应有关^[2]。目前对 HT 的甲状腺自身抗体尚无有效的特殊治疗方法,绝大多数病例仅局限于被动随访观察,直至发生甲状腺功

能减退才开始用药。HT 的发生除与基因、环境因素等有关,T 细胞异常是 HT 发生免疫功能紊乱的关键,而 Th1/Th2 的极化偏移在 HT 发生、发展和病程演变中起着极为重要的作用^[3]。本研究建立实验性自身免疫性甲状腺炎(EAT)大鼠模型,观察人参皂苷对 EAT 大鼠甲状腺自身抗体的变化及 Th1 及 Th2 类细胞的免疫调节作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康清洁级 Wistar 雌性大鼠 40 只,6~8 周龄,体重 180~200 g,由浙江中医药大学实验动物中

心提供,动物合格证号:SYXK(浙)2008-0115。

1.2 药物及试剂

人参皂苷(商品名:派能达胶囊,院内制剂)由浙江省中医院提供,制剂批准号:2010L00856。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。TGAbs(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:RT096634A)酶联免疫检测试剂盒均为美国 R&D 公司产品。

1.3 主要仪器

酶标仪,型号:Bio-Tek ELX8000(美国);离心机,型号:CL31-CL21R(法国 Thermo);37℃ 电热恒温培养箱,型号:3111(法国 Thermo);电子秤,型号:AL204(上海梅特勒托利多仪器有限公司)。

1.4 造模方法

参照文献[4]方法,将 PTg 用 PBS 缓冲液溶解成含量为 2 mg/ml 的溶液,与 CFA 体积混合充分乳化,在大鼠足垫部皮下注射 100 g/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 100 g/只,每周加强 1 次至第 6 周结束。

1.5 实验分组与给药

40 只大鼠采用随机数字表法分成正常组、模型组及人参皂苷低、中、高剂量组,每组 8 只,人参皂苷低、中、高剂量组分别给予人参皂苷 14、28、56 mg/kg,每日灌胃 1 次,于造模结束后即第 7 周起,共灌胃 8 周。正常组及模型组给予等量蒸馏水灌胃。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 甲状腺抗体检测 各组大鼠于第 15 周心脏取血,离心 1500 r/min 获取血清,按照 TGAbs 和 TPOAb 测定试剂盒说明书采用放射免疫法测定 TGAbs、TPOAb。

1.6.2 细胞因子检测 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。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,满足正态性和方差齐性,采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠血清 TGAbs、TPOAb 水平比较

表 1 示,与正常组比较,模型组大鼠的 TGAbs、

TPOAb 显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,人参皂苷低、中剂量组的 TGAbs、TPOAb 均有所下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),人参皂苷高剂量组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠血清甲状腺激素水平比较(IU/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TGAbs	TPOAb
正常组	8	175.10±8.76	86.22±4.98
模型组	8	202.22±19.71*	97.31±5.01*
人参皂苷低剂量组	8	186.86±4.64 [△]	89.45±4.68 [△]
人参皂苷中剂量组	8	188.95±7.02 [△]	91.00±6.29 [△]
人参皂苷高剂量组	8	192.11±5.12	94.56±5.42

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

2.2 各组大鼠血清 IL-2、IL-4 比较

表 2 示,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,人参皂苷低剂量组大鼠 IL-2 有所下降,人参皂苷低、中剂量组大鼠 IL-4 显著上升,差异有统计学意义($P < 0.05$);人参皂苷高剂量组大鼠血清 IL-2、IL-4 与模型组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

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

组别	鼠数	IL-2	IL-4
正常组	8	784.75±13.52	218.75±9.55
模型组	8	855.38±71.44*	197.82±8.51*
人参皂苷低剂量组	8	816.96±26.52 [△]	207.53±13.64 [△]
人参皂苷中剂量组	8	847.63±17.48	208.35±9.12 [△]
人参皂苷高剂量组	8	831.62±35.24	92.56±5.42

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

3 讨论

HT 是一种器官特异性自身免疫性疾病,源于机体免疫状态的异常。EAT 动物模型与人类 HT 具有相同的病理学基础与表现,因而被广泛用于 HT 的研究[5]。目前 HT 发病机制仍未完全阐明,感染、异常的甲状腺-免疫相互影响、大量细胞因子和受体等作用破坏了甲状腺自身免疫耐受,并刺激免疫效应细胞(Th1、Th2、Th17)在调节性 T 细胞缺陷的背景下导致甲状腺淋巴细胞浸润和 B 淋巴细胞活化产生各种针对甲状腺自身抗原的抗体[6]。Th1 可分泌肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ)和 IL-2 等细胞因子,主要介导细胞免疫,Th2 可分泌 IL-4、白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-10(IL-10)等,主要介导体液免疫。细胞因子不仅可以直接影响机体免疫细胞的活性,而且可以影响甲状腺细胞免疫相关分子的表达。IL-2 可调节 Th1 和 Th2 细胞的分化、增殖,上调细胞毒性 T 细

胞和自然杀伤细胞(NK)活性,介导自身组织损伤^[7]。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,促进Th2型细胞分化增殖,抑制Th1型细胞因子的分泌,从而减少Th1型细胞免疫反应造成的组织损伤^[8]。研究表明,Th1型细胞因子所介导的细胞免疫在自身免疫性甲状腺炎的发病中起重要作用^[9]。本实验发现EAT大鼠IL-2表达量高于正常组,IL-4表达量低于正常组,HT细胞失衡以Th1细胞占优势。

HT属于中医“瘰病”范畴,本病的病因主要与情志、饮食、水土及体质因素有关,病机为气滞、痰凝、血瘀结于颈前,由于本病起病较缓,病程较长,为慢性消耗性疾病,最终导致患者正气内虚,故采用补益正气,疏肝解郁,化痰祛瘀等治法^[10]。人参与其有效成分具有广泛的生物活性及医疗用途,现代药理研究表明人参皂苷具有双向免疫调节作用,能改善实验动物的非特异性免疫和特异性免疫功能^[11],用于治疗多种免疫系统紊乱疾病。本研究结果表明,人参皂苷能够降低EAT大鼠血清TGAb、TPOAb水平,能够降低IL-2,升高IL-4,证明人参皂苷治疗HT的有效性,其作用机制可能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。本实验中治疗效佳的为中、低剂量,这可能与人参皂苷本身所具有的双向免疫调节作用有关,今后的实验应对用药剂量有进一步研究。

参考文献

- [1] Pearce EN, Farwell AP, Braverman LE. Thyroiditis[J]. N Engl J Med, 2003, 348(26): 2646-2655.
- [2] 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): 414-415.

- [3] 吴莉. Th1/Th2的平衡与自身免疫性甲状腺疾病[J]. 国外医学:儿科学分册, 2001, 28(5): 250-253.
- [4] Verginis P, Stanford MM, Carayanniotis G. Delineation of five thyroglobulin T cell epitopes with pathogenic potential in experimental autoimmune thyroiditis [J]. J Immunol, 2002, 169(9): 5332-5337.
- [5] Many MC, Maniratunga S, Denef JF, et al. The non-obese diabetic (NOD) mouse; an animal model for autoimmune thyroiditis[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 1996, 104 (Suppl 3): 17-20.
- [6] Lichiardopol C, Mota M. The thyroid and autoimmunity [J]. Rom J Intern Med, 2009, 47(3): 207-215.
- [7] Drugarin D, Negru S, Koreck A, et al. The pattern of a T (H)1 cytokine in autoimmune thyroiditis[J]. Immunol Lett, 2000, 71(2): 73-77.
- [8] Phenekos C, Vryonidou A, Gritzapis AD, et al. Th1 and Th2 serum cytokine profiles characterize patients with Hashimoto's thyroiditis (Th1) and Graves' disease (Th2) [J]. Neuroimmunomodulation, 2004, 11(4): 209-213.
- [9] 崔巍, 施秉银. 自身免疫性甲状腺疾病患者甲状腺内Th1/Th2细胞失衡研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2004, 20(2): 96-99.
- [10] 王卫霞, 王谦. 人参皂苷的免疫调节作用及其应用[J]. 中华中医药杂志, 2005, 20(4): 234-236.
- [11] 高天舒, 齐腾澈. 海藻玉壶汤及其拆方对大鼠碘缺乏致甲状腺肿的干预作用[J]. 中医杂志, 2012, 53(10): 1671-1676.

(收稿日期: 2013-05-03; 修回日期: 2013-10-14)

[编辑: 邓媛]

(上接第2131页)

- [6] 张新江, 常丽英, 张苏明, 等. 大鼠自体血栓大脑中动脉闭塞模型的改良[J]. 卒中与神经疾病, 2003, 10(1): 12-15.
- [7] 刘瑜, 胡文立, 宋爱利, 等. 大鼠脑血栓模型的实验研究[J]. 实用医学杂志, 2005, 21(18): 1992-1993.
- [8] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 203-204.
- [9] 周超杰. 益气活血通络汤治疗缺血性脑中风64例[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 237-238.
- [10] 黄宇虹. 中风病急性期证候学研究[D]. 天津: 天津中医药大学, 2005: 29.
- [11] 张玉莲, 周震, 王立存, 等. 化痰通络法联合尿激酶溶栓治疗急性脑梗死临床研究[J]. 天津中医药, 2010, 27(1): 12-15.
- [12] 周震, 宋宛珊, 王占奎. 化痰通络法对急性脑梗死大鼠溶

栓后血脑屏障通透性及海马内皮细胞超微结构的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2011, 21(1): 22-25.

- [13] Persidsky Y, Heilman D, Haorah J, et al. Rho-mediated regulation of tight junction during monocyte migration across blood-brain barrier in HIV-1 encephalitis (HIVE) [J]. Blood, 2006, 107(12): 4770-4880.
- [14] 茅锐, 王振华. 缺血再灌注对血脑屏障紧密连接蛋白的影响[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2010, 30(3): 235-242.
- [15] Kis B, Snipes JA, Deli MA, et al. Chronic adrenomedullin treatment improves blood-brain barrier function but has no effects on expression of tight junction proteins[J]. Acta Neurochir Suppl, 2003, 86: 565-568.

(收稿日期: 2013-06-13; 修回日期: 2013-08-12)

[编辑: 邓媛]