

白芍总苷胶囊对自身免疫性甲状腺炎模型大鼠 Treg 细胞的影响*

余欣然¹, 向楠^{2△}, 李家园¹, 李章青¹

(1. 湖北中医药大学, 湖北 武汉 430065; 2. 湖北中医药大学第一临床学院, 湖北 武汉 430061)

摘要: **目的** 研究白芍总苷胶囊对于自身免疫性甲状腺炎(AIT)模型大鼠调节性 T 细胞(Treg)的影响。**方法** 40 只 4~5 周 SD 雌性大鼠为研究对象,按照随机数表法分为空白对照组、模型组、白芍总苷组、硒酵母组,每组各 10 只,模型组、白芍总苷组、硒酵母予以皮下注射猪甲状腺球蛋白(pTg),并配合高碘水喂养制造 AIT 模型,同时白芍总苷组、硒酵母组分别予以白芍总苷、硒酵母生理盐水溶液灌胃,6 周后处死大鼠,酶联免疫吸附法(ELISA)检测大鼠血清促甲状腺激素(TSH)、甲状腺球蛋白抗体(TGAb)、甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)水平,流式细胞仪检测大鼠脾脏 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例。**结果** 模型组大鼠 TSH、TGAb、TPOAb 水平较空白组显著升高,白芍总苷、硒酵母组低于模型组,且白芍总苷组各指标均低于硒酵母组,差异具有统计学意义($P<0.05$);模型组大鼠脾脏 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 比例低于空白对照组,白芍总苷、硒酵母组高于模型组,差异具有统计学意义($P<0.05$),白芍总苷组与硒酵母组对比差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 白芍总苷胶囊可降低 AIT 大鼠 TSH、TGAb、TPOAb 水平,改善免疫失衡状态,可能与其提高 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 比例的功能相关。

关键词: 白芍总苷; 自身免疫性甲状腺炎; 大鼠; 调节性 T 细胞

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)06-0005-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.06.002

自身免疫性甲状腺炎(autoimmune thyroiditis, AIT)是一种人类常见的特异性自身免疫性疾病,主要包括 Graves 病和桥本氏甲状腺炎,流行病学调查其发病率在 5%左右^[1],主要特征为甲状腺的大量淋巴细胞浸润,可伴有一过性甲亢,终致甲减,且与甲状腺癌的发生相关^[2]。其发病机制尚不十分明确,目前认为与环境、遗传、免疫功能失衡等相关。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Tregs 属于 T 细胞亚群,近年研究发现具有维持免疫功能稳定,能通过识别自身抗原而抑制反应性 T 细胞的免疫反应,从而防止自身免疫性疾病发生^[3-4]。有研究已经证实了 Tregs 的消耗与自身免疫性甲状腺炎的发生具有相关性^[5],但中药及中成药对于 Tregs 的作用研究较少。白芍总苷胶囊具有抗炎免疫调节的作用,对多种自身免疫性疾病有较好的疗效,也用于 AIT 的治疗。本研究旨在探讨白芍总苷胶囊对 AIT 大鼠 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Tregs 的影响,进一步明确 AIT 的发病机制及药物作

用机理。

1 资料与方法

1.1 实验动物

4~5 周雌性 SD 大鼠 40 只,购于湖北省疾病预防控制中心,动物许可证号 SCXK(鄂)2016-0013,来源证号: NO.42000600015772。饲养于湖北中医药大学动物房。温度 22~26℃,湿度 55%~65%,灯光模拟昼夜交替环境。

1.2 实验试剂及材料

白芍总苷胶囊(帕夫林):购于宁波立华制药有限公司,批号:国药准字 H20055058;硒酵母片(西维尔):由牡丹江灵泰药业有限公司提供,批号:国药准字 H10940161。白芍总苷使用时去外胶囊壳,将内粉末溶于生理盐水,硒酵母碾碎后溶于生理盐水;猪甲状腺球蛋白(PTg)、碘化钠(NaI)、PBS 缓冲液、完全弗氏佐剂(CFA)、不完全弗氏佐剂(IFA)、PBS 缓冲液,均购自 sigma 公司;PE-Cy5 Mouse Anti-Rat

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

收稿日期: 2017-11-18

作者简介: 余欣然(1989-),女,湖北广水人,在读博士研究生,研究方向:中医药防治内分泌和代谢性疾病。

△通信作者: 向楠, E-mail: hbyydxbs@163.com

CD4、FITC Mouse Anti-Rat CD25 购于美国 BD 公司, Foxp3-PE 购于美国 eBioscience 公司。

1.3 造模方法

所有大鼠适应性饲养 1 周,第 2 周开始造模。初次免疫:将 PTg 与 CFA 等体积混合后于大鼠足垫及背部皮肤多点注射,注射量为 PTg 100 μ g/只,每周 1 次,连续 2 周。加强免疫:将 PTg 与 IFA 等体积混合后于大鼠足垫、背部皮肤多点注射,注射量为 PTg100 μ g/只,每周 1 次,连续 4 周。造模开始的同时配合 0.64g/L 的高碘水喂养,注意现配现用,避光保存^[6]。

1.4 给药方法

造模第 4 周开始药物干预,空白对照组与模型组每天予以生理盐水 0.5mL $\cdot$ 100g⁻¹灌胃,白芍总苷组予每天以白芍总苷生理盐水溶液 50mg $\cdot$ 100g⁻¹灌胃,硒酵母组每天给予硒酵母生理盐水溶液 20 μ g $\cdot$ 100g⁻¹灌胃,服连续 6 周。

1.5 检测方法

1.5.1 血清 TSH、TGAb、TPOAb 水平检测

给药结束后,禁食禁水 12h,将大鼠固定鼠台上,10%水合氯醛麻醉,切开腹部皮肤,打开胸腔,取心脏血 5mL,置于离心机中,以 2 000r/min 的转速离心 10min 后,取上层清液,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清 TSH、TGAb、TPOAb 水平,操作方法严格按照试剂盒要求说明进行。

1.5.2 脾脏单细胞悬液制备

取出处死后大鼠的脾脏,置于 DMEM 培养液中,

于细胞筛网中研磨,收集筛网下细胞悬液,低速离心 5min 后弃上清液,红细胞裂解液与 PBS 溶液重悬细胞后离心,弃上后再次加入 PBS 重悬,即可得到脾脏单细胞悬液。

1.5.3 Treg 细胞的染色检测

在每管脾脏单细胞悬液中加入 3 μ L CD4-PE cy5 和 CD25-FITC 抗体,用流式染色缓冲液洗涤 1 次,低速离心 5min 后弃上清液,加入 IX 破膜固定剂重悬细胞,低速离心后弃上清液,加入破膜液稀释为 10 倍 IX 工作液,离心弃上清,加入 Foxp3-PE 抗体,避光保存,24h 内上流式细胞仪分析 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达百分率。

1.6 统计学方法

采用 SPSS19.0 对数据进行统计分析,所有数据均符合正态分布,多组间计量资料比较采用 *F* 检验,组间两两比较采用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 各组大鼠 TSH、TGAb、TPOAb 水平对比

模型组大鼠 TSH、TGAb、TPOAb 水平较空白组显著升高,白芍总苷、硒酵母组低于模型组,且白芍总苷组各指标均低于硒酵母组,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

2.2 各组大鼠 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 比例

模型组大鼠脾脏 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 比例低于空白对照组,白芍总苷、硒酵母组高于模型组,差异具有统计学意义($P<0.05$),白芍总苷组与硒酵母组对比差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 1 各组大鼠 TSH、TGAb、TPOAb 水平对比

组别	<i>n</i>	TSH/(pg $\cdot$ mL ⁻¹)	TGAb/(pg $\cdot$ mL ⁻¹)	TPOAb/(pg $\cdot$ mL ⁻¹)
空白组	10	1956.87 $\pm$ 198.45	229.88 $\pm$ 20.16	2390.50 $\pm$ 256.83
模型组	10	4086.90 $\pm$ 179.37 ^a	570.97 $\pm$ 28.02 ^a	4813.85 $\pm$ 219.36 ^a
硒酵母组	10	3146.84 $\pm$ 262.02 ^{ab}	390.01 $\pm$ 39.26 ^{ab}	3336.73 $\pm$ 127.84 ^{ab}
白芍总苷组	10	2657.78 $\pm$ 268.18 ^{abc}	349.65 $\pm$ 31.19 ^{abc}	3187.24 $\pm$ 160.49 ^{abc}
<i>F</i> 值		142.836	215.591	251.074
<i>F</i> 值		0.000	0.000	0.000

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与硒酵母组比较,^c $P<0.05$

表 2 各组大鼠 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 比例

组别	空白组	模型组	硒酵母组	白芍总苷组	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	18.98 $\pm$ 3.43	12.73 $\pm$ 3.919 ^a	18.29 $\pm$ 2.53 ^b	16.00 $\pm$ 2.11 ^b	4.197	0.023

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$

3 讨论

由于 AIT 发病的病因病机尚不十分明确,目前无针对病因病机的确切有效的治疗方法,现仅对已发生甲减患者采用甲状腺激素替代治疗^[7],或使用免疫调节剂,如糖皮质激素^[8]、免疫抑制剂^[9]、PPT^[10]、雷公藤多苷片^[11]。有研究认为缺硒与 AIT 的发生密切相关,补硒后血清硒浓度显著增加,血清 TgAb 滴度降低^[12],因此,临床常用硒酵母片来治疗 AIT,获得了一定的疗效,但也有专家提出,血清中硒的浓度并不反映甲状腺组织内的硒水平^[13],补硒疗法尚待商榷。因此,寻找一种有效、安全的治疗 AIT 的方法,在临床上具有积极意义。

白芍又称白花芍药,是毛茛科芍药属植物,性凉,味苦酸,微寒,有益气养血,行痹通络、柔肝止痛之功,白芍总苷是从白芍中提取的一种主要有效成分,现代药理学研究证实是一种抗炎免疫调节剂,能调节机体的细胞免疫及体液免疫,抑制自身免疫反应^[14],应用于类风湿关节炎、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病,也用于自身免疫性甲状腺炎的治疗。

CD4⁺是细胞免疫中的主要效应细胞,通过对抗原的识别、处理、提呈,可分化为不同的亚群^[15],Treg 细胞最开始指 CD4⁺CD25⁺T 细胞,是具有免疫抑制功能的 T 细胞亚群,但随着研究的深入,逐渐确立了 Foxp3 的免疫特性,被认为是 Treg 的标志物,现 Treg 指 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg T 细胞群。Treg 分为天然型 T 细胞(natural Treg, nTreg)和诱导型 T 细胞(induced Treg, iTreg)两类, nTreg 在胸腺内发育,稳定表达 Foxp3, iTreg 是由 T 细胞在外周活化,可以上调表达 Foxp3。Treg 可通过细胞之间直接接触方式或通过细胞因子方式抑制自身反应性 T 细胞的活化增殖^[16],发挥免疫调节作用,维持免疫耐受,涉及多种机制^[17]。例如 Treg 细胞可表达 CTLA-4,竞争性抑制 CD28,阻碍阻碍第二信号的传递,致使效应 T 细胞进入失能状态, Treg 的缺失和功能障碍可导致多种自身免疫性疾病^[18]。有研究发现, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 的免疫负调节作用已经参与了 AIT 发病早期自身免疫机制^[19]。

从本研究中看出, AIT 模型大鼠的 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Tregs 比例显著降低,提示 AIT 的发生可能与 Tregs 的消耗相关。在临床中,桥本氏甲状腺炎伴甲减的患者 TSH 水平越高,患者症状越重, TGAb、TPOAb

水平越高,则表示免疫功能越紊乱,而有研究发现 Tregs 与 TSH、TGAb、TPOAb 呈显著负相关^[20],代表我们可能可以通过监测 Tregs 的比例与功能来判断患者的病情。在用白芍总苷胶囊干预后,大鼠 TSH、TGAb、TPOAb 水平均明显下降,且降低水平优于硒酵母组,而 Tregs 比例显著上升,证实白芍总苷能调节 AIT 大鼠的免疫功能,改善甲减症状,而这种功能有可能是通过调节 Tregs 的比例来实现的。在将来进一步研究中,笔者将重点探讨白芍总苷调节 AIT 大鼠 Tregs 的作用机制。

参考文献:

- [1] Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, et al. Auto immune thyroid disorders [J]. Autoimmun Rev, 2015, 14 (2): 174-180.
- [2] Kurukahvecioglu O, Taneri F, Yüksel O, et al. Total thyroidectomy for the treatment of Hashimoto's thyroiditis coexisting with papillary thyroid carcinoma [J]. Advances in Therapy, 2007, 24 (3): 510-516.
- [3] 邓海峰, 许文荣, 蒋敬庭. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞在 CIK 细胞诱导中的表达及其功能 [J]. 临床检验杂志, 2016, 34 (7): 555-558.
- [4] Pandiyan P, Zhu J. Origin and functions of pro-inflammatory cytokine producing Foxp3⁺ regulatory T cells [J]. Cytokine, 2015, 76 (1): 13-24.
- [5] Glick AB, Wodzinski A, Fu P, Levine AD, Wald DN. Impairment of regulatory T-cell function in autoimmune thyroid disease [J]. Thyroid, 2013, 23 (7): 871-878.
- [6] 邓莉, 孙文, 侯毅, 等. 自身免疫性甲状腺炎实验动物模型的研究进展 [J]. 天津中医药, 2016, 33 (3): 189-192.
- [7] 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): 155-158.
- [8] 马中书, 邱明才. 糖皮质激素在自身免疫性甲状腺疾病治疗中的选择和应用 [J]. 中国全科医学, 2010, 13 (2): 113-115.
- [9] 李冬梅, 李倩, 马建华, 等. 甲状腺内注射地塞米松和环磷酰胺治疗桥本甲状腺炎 [J]. 海南医学, 2008, 19 (1): 20-21.
- [10] Negro R, Greco G, Mangieri T, et al. The influence of selenium supplementation on postpartum thyroid status in pregnant women with thyroid peroxidase autoantibodies [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92 (4): 1263-1268.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Drutel A, Archambeaud F, Caron P. Selenium and the thyroid gland: more good news for clinicians [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2013, 78(2): 155-164.
- [14] 徐艳, 董彦琴. 白芍总苷对小鼠淋巴细胞体外增殖活化影响的研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2013, 31(4): 914-917.
- [15] Petrillo MG, Ronchetti S, Ricci E, et al. GITR+ regulatory T cells in the treatment of autoimmune diseases [J]. *Autoimmun Rev*, 2015, 14(2): 117-126.
- [16] 江强, 苏占涛. 自身免疫性甲状腺炎大鼠 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞变化及意义 [J]. *医学检验与临床*, 2010, 21(2): 59-61.
- [17] Pankratz S, Ruck T, Meuth SG, et al. CD4⁺ HLA-G⁺ regulatory T cells: molecular signature and pathophysiological relevance [J]. *Hum Immunol*, 2016, 77(9): 727-733.
- [18] Kleinewietfeld M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation [J]. *Immunol Rev*, 2014, 259(1): 231-244.
- [19] 王茂林, 孙斌杰, 鲍慧文, 等. 实验性自身免疫性甲状腺炎小鼠外周血 Treg、Th 细胞的检测分析 [J]. *皖南医学院学报*, 2017, 36(6): 521-531.
- [20] 黄广英, 禰文婷, 何灵杰. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Tregs 在自身免疫性甲状腺疾病中的作用研究 [J]. *中国医学创新*, 2017, 14(23): 16-20.
- (编辑: 徐建平)

Effect of Total Glucosides of Paeony Capsules on Treg Cells in AIT Model Rats

YU Xinran¹, XIANG Nan², LI Jiayuan¹, LI Zhangqing¹

(1. Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

2. The First Clinical College, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

ABSTRACT: **Objective** To study and explore the effect of Total Glucosides of Paeony Capsules on the regulatory T cells (Treg) of autoimmune thyroiditis (AIT) model rats. **Methods** Forty SD rats aged 4~5 weeks were divided into blank control group, model group, total glucosides of paeony, selenium yeast group, 10 rats in each group, model group, white group (PTg) was injected subcutaneously into the pituitary gland glycosides group and selenium yeast, and AIT model was induced by high iodine water feeding. At the same time, the total glucosides of paeoniflorin group and the selenium yeast group were respectively treated with total glucosides of paeony and selenium yeast physiological saline solution After 6 weeks, the rats were sacrificed and the levels of serum TSH, TGAb and TPOAb were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Proposed according to the acronym requirements specification, flow cytometry rat spleen CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg cell ratio. **Results** The levels of TSH, TGAb and TPOAb in model group were significantly higher than those in blank group. The total glucosinolate and selenium in paeony were lower than those in model group, and the indexes in paeoniflorin were lower than those in selenium group ($P < 0.05$). The proportion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg in spleen of rats in model group was lower than that of blank control group, the total glucosinolate and selenium of paeony was higher than that of model group ($P < 0.05$) There was no significant difference between the groups of total glucosides of paeony and selenium ($P > 0.05$). **Conclusion** Total Glucosides of Paeony Capsules can reduce the level of TSH, TGAb and TPOAb in AIT rats, and improve the immune imbalance, which may be related to the function of increasing the proportion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg.

KEY WORDS: total glucoside of Paeonia lactiflora; autoimmune thyroiditis; rat; regulatory T cells