

海藻玉壶汤加减方对自身免疫性甲状腺炎模型大鼠的保护作用[△]

陈然峰^{1*}, 田 港², 张小燕², 唐晓霞², 宋霄宏^{2#}(1.武警浙江省总队杭州医院, 杭州 310051; 2.浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

中图分类号 R285.5; R593.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)03-0215-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.03.08

摘要 目的:研究海藻玉壶汤加减方对自身免疫性甲状腺炎(EAT)模型大鼠的保护作用。方法:多点皮下注射猪甲状腺球蛋白(PTg)进行初次免疫,于第2周进行加强免疫,以后每周加强免疫1次,共加强免疫4次,以复制大鼠EAT模型。70只SD大鼠分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、丙基硫氧嘧啶(23.43 mg/kg)组、雷公藤多苷(6.25 mg/kg)组、夏枯草(1.875 g/kg)组与海藻玉壶汤加减方高、低剂量(39.4、19.7 g/kg)组。灌胃给药,每天1次,连续16周。末次给药后大鼠眼眶取血测定血清三碘甲状腺原氨酸(T₃)、四碘甲状腺原氨酸(T₄)含量与甲状腺球蛋白抗体(TGAb)、甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)活性;取甲状腺,称定质量,计算甲状腺脏器指数(甲状腺质量/体质量)。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠T₃、T₄含量增加, TGAb活性增强,甲状腺脏器指数升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与模型组比较,海藻玉壶汤加减方高、低剂量组大鼠TGAb活性减弱,甲状腺系数降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);海藻玉壶汤加减方高剂量组大鼠T₄含量减少,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论:海藻玉壶汤加减方能调节EAT模型大鼠的甲状腺激素及抗体的水平。

关键词 海藻玉壶汤加减方;自身免疫性甲状腺炎;三碘甲状腺原氨酸;四碘甲状腺原氨酸;甲状腺球蛋白抗体;甲状腺过氧化物酶抗体

Protective Effect of Modified Haizao Yuhu Decoction on Autoimmune Thyroiditis Model Rats

CHEN Ran-feng¹, TIAN Gang², ZHANG Xiao-yan², TANG Xiao-xia², SONG Xiao-hong²(1. Hangzhou Hospital of Zhejiang Province, Armed Police Corps, Hangzhou 310051, China; 2. College of Pharmacy, Zhejiang University of TCM, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To observe the protective effect of Modified haizao yuhu decoction on autoimmune thyroiditis (EAT) model rat. METHODS: Hypodermic injection of thyroglobulin (PTg) at multi-sites was carried out for primary immunity. Supplementary immunization was conducted in second week and then strengthened once a week. EAT models were established after 4 times of supplementary immunization. 70 SD rats were divided into normal control group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), propylthiouracide group (23.43 mg/kg), tripterygium glycosides group (6.25 mg/kg), *Prunella vulgaris* group (1.875 g/kg) and Modified haizao yuhu decoction high-dose and low-dose groups (39.4 g/kg, 19.7 g/kg). They were given relevant medicines intragastrically once a day for consecutive 16 weeks. After last medication, orbital blood was collected and T₃, T₄, TGAb and TPOAb in serum of rats were measured. The thyroid gland was sampled and weighted, and then thyroid viscera index (thyroid weight/body weight) were calculated. RESULTS: Compared with normal control group, the contents of T₃ and T₄, TGAb and thyroid index were increased significantly in model group ($P < 0.01$); compared with model group, the contents of TGAb and thyroid index were decreased significantly in Modified haizao yuhu decoction high-dose and low-dose groups ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), the content of T₄ was decreased significantly in Modified haizaoyuhu decoction high-dose group ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Modified haizao yuhu decoction can adjust the thyroid hormone and antibody in the EAT rats.

KEYWORDS Modified haizao yuhu decoction; Autoimmune thyroiditis; T₃; T₄; TGAb; TPOAb

慢性淋巴性甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis, HT)又称桥本甲状腺炎,是一种以自身甲状腺组织为抗原的自身免疫性疾病,是甲状腺疾病中最常见的类型^[1]。目前临床上缺乏治疗HT的有效药物,患者的症状也往往被忽视,由于未能得到及时治疗而致使甲状腺自身抗体持续升高,自身免疫性炎症不能得到有效的控制,最终严重损害甲状腺组织结构及功能,

并引发一系列的病变,如甲状腺机能亢进、甲状腺机能减退、甲状腺内结节、甲状腺肿瘤等^[2]。海藻玉壶汤加减方是依据明代陈实功《外科正宗》海藻玉壶汤,经临床辨证施治,加减而成,临床主治甲状腺机能亢进、脂膜炎、乳腺增生等多种疾病。本研究通过复制大鼠自身免疫性甲状腺炎(EAT)模型,观察海藻玉壶汤加减方对模型大鼠甲状腺激素与抗体水平的影响,为其治疗HT的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

BN1431型分析天平(上海民桥精密科学仪器有限公司); RE-5205型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);电热恒温水浴

[△] 基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(No.Y2110967);浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划项目(No.2012R410058)

* 副主任技师。研究方向:医学检验。E-mail:hzcrf123@163.com

通信作者:研究员,硕士研究生导师。研究方向:中药新药与中药质量标准。E-mail:songxiaohong999@163.com

锅(巩义市予华仪器有限责任公司);微量移液器,5804R型离心机(德国Eppendorf公司);Unicel DXI800型免疫分析系统(美国Beckman公司)。

1.2 药材

海藻、半夏、夏枯草购自武警浙江省总队杭州医院中药房,经笔者鉴定为真品。

1.3 药品与试剂

丙基硫氧嘧啶(南通精华制药股份有限公司,批号:110102);雷公藤多苷片(浙江得恩德制药有限公司,批号:1110102);夏枯草膏(李时珍医药集团有限公司,批号:201111010);猪甲状腺球蛋白(PTg)、完全弗氏佐剂(CFA)、不完全弗氏佐剂(IFA)均购自美国Sigma公司;三碘甲状腺原氨酸(T_3 ,批号:111448)、四碘甲状腺原氨酸(T_4 ,批号:112779)、甲状腺球蛋白抗体(TGAb,批号:119562)、甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)测试盒(批号:110077)均购自美国Beckman公司。

1.4 动物

SPF级SD大鼠70只,♀,体质量160~180 g,由中国科学院上海实验动物中心/上海斯莱克实验动物有限责任公司提供[实验动物使用许可证号:SCXK(沪)2007-0005]。

2 方法

2.1 海藻玉壶汤加减方(浸膏)的制备

海藻、半夏、夏枯草等药材按处方比例提取2次,第1次加水12倍量,1.5 h,第2次加水10倍量,1.5 h,滤过,合并滤液,浓缩,备用;川芎按处方比例以乙醇回流提取,60%乙醇8倍量,提取3次,每次2 h,滤过,合并滤液,浓缩,与上述药液混合,并浓缩至含生药为2.74 g/ml,贮藏,备用。

2.2 模型的复制^[3-5]

PTg用生理盐水溶解,制成质量浓度为2 mg/ml的溶液,与CFA按1:1(V/V)混合,乳化油包水乳剂。每只大鼠用100 μg PTg乳剂多点皮下注射进行初次免疫,用生理盐水溶解的PTg溶液与IFA按1:1(V/V)混合后于第2周进行加强免疫,以后每周加强免疫1次,共加强免疫4次。

2.3 分组与给药

70只大鼠随机均分为7组,即正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、丙基硫氧嘧啶(23.43 mg/kg)组、雷公藤多苷片(6.25 mg/kg)组、夏枯草膏(1.875 g/kg)组与海藻玉壶汤加减方高、低剂量(39.4、19.7 g/kg)组。复制模型24 h后ig给药,每天1次,连续16周。

2.4 标本的采集

末次给药1 h后处死大鼠,眼眶取血,收集血液于干净的离心管中,4℃冰箱中放置12 h,以离心半径为8 cm、2 000 r/min离心20 min,分离血清,血清存入1.5 ml离心管中,-20℃贮藏。取血后,解剖全部大鼠,摘取甲状腺,电子天平称质量。

2.5 指标的检测

2.5.1 动物一般状况 观察大鼠的精神、食欲、活动情况。

2.5.2 脏器系数的计算 处死大鼠,摘取甲状腺,称质量,计算甲状腺脏器指数(甲状腺质量/体质量)。

2.5.3 大鼠甲状腺抗体及激素水平检测 采用化学发光法测定大鼠血清 T_3 、 T_4 、TGAb、TPOAb水平,具体检测步骤按测试盒说明书进行操作。

2.6 统计学方法

采用SPSS 13.0软件包进行统计分析,资料数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间单因素比较先用单因素分析其正交分布,后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般状况

在整个给药期间,雷公藤多苷片组偶见个别大鼠精神不振、倦卧少动的现象,其余各给药组大鼠进食、活动及毛发基本无异常变化。

3.2 海藻玉壶汤加减方对模型大鼠甲状腺脏器指数的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠甲状腺系数升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),表明模型组大鼠甲状腺发生肿大较为明显;与模型组比较,海藻玉壶汤加减方高、低剂量组大鼠甲状腺脏器指数降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。海藻玉壶汤加减方对模型大鼠甲状腺脏器指数的影响见表1。

表1 海藻玉壶汤加减方对模型大鼠甲状腺脏器指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Effects of Modified haizao yuhu decoction on thyroid coefficient in model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量,g/kg	体质量,g	甲状腺脏器指数,mg/100 g
正常对照组		305.00±24.52	7.04±1.97
模型组		307.20±8.07	9.08±2.10*
海藻玉壶汤加减方低剂量组	19.7	308.00±17.23	7.26±2.22*
海藻玉壶汤加减方高剂量组	39.4	307.00±17.57	7.27±1.44*
丙基硫氧嘧啶组	23.43×10 ⁻³	306.90±12.40	7.11±1.97*
雷公藤多苷片组	6.25×10 ⁻³	300.00±23.29	7.17±1.70*
夏枯草膏组	1.875	308.90±16.83	7.40±1.54*

与正常对照组比较: * $P < 0.05$;与模型组比较: # $P < 0.05$

vs.normal control group: * $P < 0.05$;vs.model group: # $P < 0.05$

3.3 海藻玉壶汤加减方对模型大鼠甲状腺激素水平的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠血清 T_3 、 T_4 水平升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与模型组比较,海藻玉壶汤加减方高剂量组大鼠血清 T_4 水平降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。海藻玉壶汤加减方对模型大鼠甲状腺激素水平的影响见表2。

表2 海藻玉壶汤加减方对模型大鼠甲状腺激素水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Effects of Modified haizao yuhu decoction on thyroid hormones in model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量,g/kg	T_3 ,ng/ml	T_4 ,μg/dl
正常对照组		1.05±0.14	4.94±1.35
模型组		3.63±2.23*	47.18±13.73**
海藻玉壶汤加减方低剂量组	19.7	2.62±1.91	48.13±12.61
海藻玉壶汤加减方高剂量组	39.4	1.56±0.46	34.10±15.84#
丙基硫氧嘧啶组	23.43×10 ⁻³	3.47±2.34	51.03±12.27
雷公藤多苷片组	6.25×10 ⁻³	3.27±3.11	42.25±11.89
夏枯草膏组	1.875	4.79±3.06	57.06±19.36

与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较: # $P < 0.05$

vs.normal control group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;vs.model group: # $P < 0.05$

3.4 海藻玉壶汤加减方对模型大鼠甲状腺抗体水平的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠血清TGAb水平升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,海藻玉壶汤加减方高、低剂量组大鼠血清TGAb水平降低,差异具有统计学意义

义($P<0.01$)。海藻玉壶汤加减方对模型大鼠甲状腺抗体水平的影响见表3。

表3 海藻玉壶汤加减方对模型大鼠甲状腺抗体水平的影响
($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 Effects of Modified haizao yuhu decoction on thyroid autoantibodies in model rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,g/kg	TGAb,U/ml	TPOAb,U/ml
正常对照组		0.19±0.13	0.18±0.92
模型组		54.86±56.37*	0.10±0.05
海藻玉壶汤加减方低剂量组	19.7	11.83±9.69*	0.15±0.05
海藻玉壶汤加减方高剂量组	39.4	9.22±4.02*	0.10±0.00
丙基硫氧嘧啶组	23.43×10 ⁻³	10.16±6.03*	0.12±0.06
雷公藤多苷片组	6.25×10 ⁻³	9.65±5.47*	0.13±0.04
夏枯草膏组	1.875	9.70±6.26*	0.12±0.08

与正常对照组比较:* $P<0.01$;与模型组比较:† $P<0.01$

vs.normal control group:* $P<0.01$;vs.model group:† $P<0.01$

4 讨论

HT的甲状腺损害机制迄今尚未完全清楚,但大量的临床与实验研究表明,其发病机制与免疫功能紊乱和炎症介质的损伤有关,与细胞凋亡也相关^[6]。HT患者表现为抑制性T细胞(Ts)减少,Ts和辅助性T细胞(Th)平衡紊乱,免疫调节失控,导致自身特异性抗体特别是TGAb和TPOAb增高,因此TGAb和TPOAb水平升高是鉴别和诊断HT重要的实验室依据。随着免疫技术的发展,全自动化化学发光免疫分析系统正在逐步替代传统放射免疫法检测血清中的TGAb和甲状腺微粒体抗体(TMAb),更有人提出检测TPOAb比TMAb更具有临床价值^[7-8]。据报道,采用化学发光法测定TGAb和TPOAb,其检测结果之间相关性不明显,既可出现TGAb和TPOAb同时升高,也可出现TGAb或TPOAb单项指标增高^[9]。结合本研究,模型组大鼠血清中TGAb水平高于正常对照组,差异具有统计学意义($P<0.01$),即提示复制模型成功^[10]。

降低抗体TGAb、TPOAb在大鼠血清中的水平,对控制HT向甲减发展具有重要意义。本研究结果表明,模型组大鼠的T₃、T₄水平与正常对照组大鼠相比明显升高,这与临床HT患者早期出现的甲亢症状具有一定的相似性。高剂量海藻玉壶汤加减方具有降低模型大鼠甲状腺激素水平的趋势。本研究结果表明,其对T₄水平具有一定的调节作用。另外,与模型组比较,各用药组大鼠血清TGAb水平明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$),可见各用药组对于HT均有一定的治疗作用,其中海藻玉壶汤加减方高剂量组TGAb水平下降尤为显著。通过对实验结果的综合评判(大鼠进食、精神状况、体质量、脏器系数等),证明海藻玉壶汤加减方中诸药物配伍、用药的安全性和疗效明显优于雷公藤多苷片组、夏枯草膏组、丙基硫氧嘧啶组,表明海藻玉壶汤加减方可用于HT的治疗。

海藻玉壶汤加减方中的海藻具有降压、抗血凝、抗菌、抗病毒、抗肿瘤及提高机体免疫力等作用;国内外研究证明,海藻具有调节细胞和体液免疫的作用^[11]。半夏提取物具有较强

的网状内皮系统激活活性,能增强网状内皮系统吞噬功能和分泌作用^[12-13]。夏枯草临床多用于治疗甲状腺肿大、淋巴结核、乳腺增生等疾病^[14-15]。因此,海藻玉壶汤加减方治疗HT很可能是方中药物共同作用的结果,通过药物有效成分的配伍、协同作用,才能比较全面照顾到每个病理环节,使病因消失、病理产物清除,达到正复邪祛、机体功能恢复的目的。

参考文献

- [1] Cordioli MI, Cury AN, Nascimento AO, *et al.* Study of the histological profile of papillary thyroid carcinomas associated with Hashimoto's thyroiditis [J]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2013, 57(6):445.
- [2] 王庆兆,魏韬哲.现代甲状腺外科学[M].郑州:河南医科大学出版社,1997:202.
- [3] 潘春宇,张兰.软坚消癭汤对实验性自身免疫性甲状腺炎的影响[J].光明中医,2007,22(7):77.
- [4] Ciháková D, Sharma RB, Fairweather D, *et al.* Animal models for autoimmune myocarditis and autoimmune thyroiditis[J]. *Methods Mol Med*, 2004, 102:175.
- [5] 张雅萍,帖丽丽,张南雁,等.高碘对桥本甲状腺炎大鼠TR-AIL表达的影响[J].第四军医大学学报,2006,27(18):1668.
- [6] 周静,王成蹊,侯连兵.因宁片对甲亢性肝损害大鼠肝脏Fas、FasL、TNF- α 表达的影响[J].中国药房,2011,22(7):597.
- [7] 孙崑,宋光华,贺斌.碘和甲状腺球蛋白诱导大鼠实验性自身免疫性甲状腺炎的研究[J].中华内科杂志,2000,39(12):841.
- [8] 施秉银,马秀萍.现代甲状腺疾病诊断与治疗[M].西安:陕西科学技术出版社,1998:47.
- [9] 卢小卓,林之瑜,陈怡霓.化学发光法、放免法检测血清TGAb、TPOAb的比较[J].放射免疫学杂志,2001,14(1):20.
- [10] 张兰,方振伟.软坚消癭汤治疗实验性自身免疫性甲状腺炎疗效机制研究[J].中华中医药学刊,2010,28(4):845.
- [11] 黄铮.扶正清癭法治疗桥本氏甲状腺炎52例[J].上海中医药杂志,2003,37(21):34.
- [12] 刘寨东,王家鹏,李红霞.浅谈半夏在肿瘤疾病临证中的研究及应用[J].食品与药品,2009,11(3):75.
- [13] 王玲玲,孙宏新.豆根管食管口服液对人食管癌端粒酶活性影响的实验研究[J].时珍国医国药,2010,21(9):2387.
- [14] 杨坤,廖有乔,郭昆全,等.夏枯草口服液辅助小剂量强的松治疗亚急性甲状腺炎[J].邵阳医学院学报,2008,27(1):64.
- [15] 曹羽,陈建飞.夏枯草联合吡喹酮治疗亚急性甲状腺炎23例[J].中国中西医结合外科杂志,2009,15(3):288.

(收稿日期:2013-03-14 修回日期:2013-04-20)