

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.06.007  
文章编号: 1005-8982 (2021) 06-0032-05

基础研究·论著

## 大黄素对自身免疫性甲状腺炎小鼠的作用机制研究\*

张国平<sup>1</sup>, 李攀<sup>1</sup>, 胡通海<sup>1</sup>, 吴可人<sup>2</sup>

(1. 嵊州市中医院 外二科, 浙江 嵊州 312400; 2. 浙江中医药大学附属第一医院 肝胆外科, 浙江 杭州 310000)

**摘要:** **目的** 探讨大黄素治疗自身免疫性甲状腺炎(AT)小鼠的作用机制。**方法** 选择60只小鼠随机分为正常组、模型组和实验组, 每组20只。实验组给予75 mg/kg大黄素灌胃, 对照组和模型组灌胃等剂量生理盐水, 均1次/d, 连续8周。采用酶联免疫吸附试验测定甲状腺球蛋白抗体(TGAb)和甲状腺过氧化物酶自身抗体(TPOAb)水平; 观察甲状腺淋巴细胞浸润程度; 采用流式细胞术测定T淋巴细胞亚群变化。**结果** 正常组、模型组和实验组小鼠血清TGAb和TPOAb水平比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 实验组低于模型组( $P < 0.05$ )。3组小鼠淋巴细胞浸润程度比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 实验组低于模型组( $P < 0.05$ )。3组小鼠CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>和CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 实验组低于模型组( $P < 0.05$ )。**结论** 大黄素可下调AT小鼠血清TGAb和TPOAb水平, 减轻淋巴细胞浸润程度, 调节小鼠免疫功能。

**关键词:** 自身免疫性甲状腺炎; 大黄素; 作用机制; 小鼠

**中图分类号:** R581

**文献标识码:** A

## The mechanisms of emodin in the treatment of autoimmune thyroiditis in mice\*

Guo-ping Zhang<sup>1</sup>, Pan Li<sup>1</sup>, Tong-Hai Hu<sup>1</sup>, Ke-ren Wu<sup>2</sup>

(1. The Second Department of Surgery, Shengzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shengzhou, Zhejiang 312400, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou, Zhejiang 310000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the mechanisms of emodin in the treatment of autoimmune thyroiditis (AT) in mice. **Methods** The 60 mice were randomly divided into normal group, model group and experimental group, with 20 mice in each group. The experimental group was intragastrically given 75 mg/kg emodin once a day for 8 weeks; the control group and the model group were given the same dose of normal saline once a day for 8 weeks. The levels of thyroglobulin antibody (TGAb) and thyroid peroxidase antibody (TPOAb) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay; the degree of lymphocyte infiltration in the thyroid gland was observed; and the changes of T-lymphocyte subsets in peripheral blood were measured by flow cytometry. **Results** The serum TGAb and TPOAb levels were significantly different among the three groups, and those in experimental group were lower than those in model group ( $P < 0.05$ ). The degree of lymphocyte infiltration was distinct among the groups,

收稿日期: 2020-09-25

\* 基金项目: 2018年度绍兴市科技计划(医卫类)项目(No: 2018C30160)

[通信作者] 吴可人, E-mail: wkr3000@sina.com; Tel: 13306810620

and that in the experimental group was lower compared to that in model group ( $P < 0.05$ ). Besides, the  $CD3^+CD4^+$  and  $CD3^+CD8^+$  cell counts were different among the groups, and those in the experimental group were lower in comparison to those in model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Emodin can reduce the serum TGAb and TPOAb, ameliorate the degree of lymphocyte infiltration and regulate the immune function in AT mice.

**Keywords:** emodin; autoimmune thyroiditis; mechanism of action; mice

自身免疫性甲状腺炎 (autoimmune thyroiditis, AT) 主要是由免疫功能紊乱、环境及遗传等因素综合作用导致的自身免疫性疾病, 是细胞免疫与体液免疫共同作用的结果<sup>[1-3]</sup>。AT 发病率不断上升, 严重影响人们生活质量<sup>[4-5]</sup>。近年来, 临床上针对 AT 主要采用免疫抑制剂、糖皮质激素等治疗, 但其效果并不十分理想, 且对机体免疫功能造成较大损害<sup>[6]</sup>。而大黄素属一种蒽醌类衍生物, 具有一定的免疫抑制作用。因此, 本文研究旨在探讨大黄素治疗 AT 小鼠的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

60 只 SPF 级昆明小鼠, 雌性, 适应性饲养 1 周, 湿度 ( $55 \pm 10$ )%, 温度 ( $23 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ , 自由饮食, 购自辽宁实验动物中心, 动物生产许可证号: SCXK2017-0001, 动物使用许可证号: SCXK2017-0008。

### 1.2 主要试剂和仪器

大黄素 (南京景竹生物科技有限公司, 纯度 98%), 小鼠甲状腺球蛋白抗体 (thyroglobulin antibody, TGAb) 和甲状腺过氧化物酶自身抗体 (thyroid peroxidase autoantibody, TPOAb) 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (上海广锐生物科技有限公司)。Bio-Rad 酶标仪 (美国伯乐公司), 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

### 1.3 动物模型的复制与分组

**1.3.1 模型复制** 取 10 mg 猪甲状腺球蛋白溶于 5 ml 水, 将其与完全弗氏佐剂等体积充分混合制成油包水乳剂。取小鼠甲状腺球蛋白 0.5 ml, 均匀分布于腹部、背部 2 点皮下注射, 初次免疫为每个点注射 0.25 ml, 14 d 后取甲状腺球蛋白与不完全弗氏佐剂等体积混合, 再多点皮下注射, 持续 4 周。

**1.3.2 分组** 60 只小鼠随机分为正常组、模型组和实验组, 每组 20 只。实验组给予 75 mg/kg 大黄素灌胃, 1 次/d, 持续 8 周; 对照组和模型组灌胃等剂量生理盐水, 1 次/d, 持续 8 周。

## 1.4 方法

**1.4.1 甲状腺组织形态观察** 取小鼠甲状腺组织, 以生理盐水清洗, 在 10% 中性甲醛溶液中固定, 石蜡包埋, 连续切片, 行常规 HE 染色, 在显微镜下观察淋巴细胞浸润情况。

**1.4.2 血清 TGAb 和 TPOAb 水平检测** 各组小鼠摘眼球取血 0.3 ml, 静置 15 min, 2 500 r/min 离心 12 min, 离心半径 15 cm, 取上清液, 采用 ELISA 测定 TGAb 和 TPOAb 水平, 严格依据试剂盒说明书进行操作。

**1.4.3 甲状腺淋巴细胞浸润程度评价** 甲状腺淋巴浸润程度=滤泡间浸润程度+上皮间淋巴浸润程度。滤泡间浸润程度评价: (-) 为 0 分; ( $\pm$ ) 为 1 分; (+) 为 2 分; (++) 为 3 分; (+++) 为 4 分。上皮间浸润程度: 0 个炎细胞/张切片为 0 分; 1 或 2 个炎症细胞/张切片为 1 分; 1 个炎细胞/10 个高倍视野为 2 分; 1 个炎细胞/5 高倍视野为 3 分; 1 个炎细胞/2 高倍视野为 4 分。

**1.4.4 外周血 T 淋巴细胞亚群检测** 各组小鼠摘眼球取血 0.3 ml, 肝素抗凝, 制备成  $1 \times 10^7$  个/ml 单细胞悬液, 加入抗体, 避光染色 30 min, 加入溶血素反应 10 min, 2 500 r/min 离心 6 min, 离心半径 15 cm, 弃上清液, 加入 PBS 溶液洗涤 2 次, 加入 1% 多聚甲醛固定, 采用流式细胞术测定 T 淋巴细胞亚群变化。

## 1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计学软件。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用单因素方差分析, 进一步两两比较用 LSD- $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠甲状腺组织形态变化

正常组小鼠光镜下甲状腺滤泡呈椭圆形或者圆形，滤泡腔内充满淡红色胶质，同时内有适量吸收空泡；甲状腺肉眼观为细条状、淡红

色。模型组小鼠光镜下可见甲状腺组织中有弥漫性或灶性淋巴细胞浸润，并伴甲状腺滤泡萎缩；甲状腺滤泡上皮较正常略大，滤泡腔变小；甲状腺肉眼可见颜色变淡，并且与周围组织不粘连。实验组小鼠病变程度较模型组明显减轻。见图1。

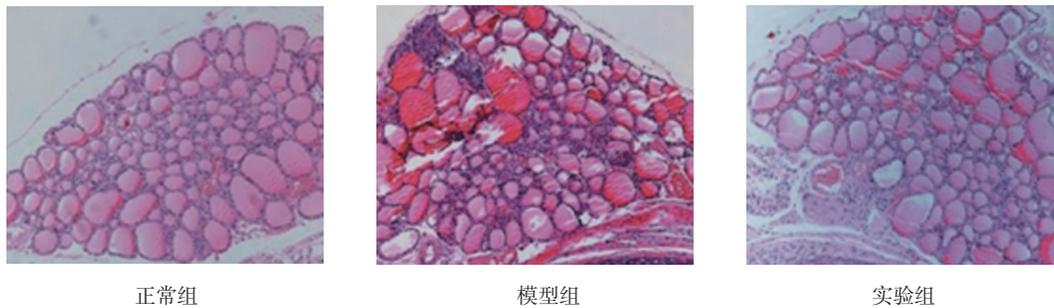


图1 各组小鼠甲状腺病理形态学观察 (HE染色×200)

### 2.2 各组小鼠血清TGAb和TPOAb水平比较

正常组、模型组和实验组小鼠血清TGAb和TPOAb水平比较，经单因素方差分析，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。进一步两两比较结果显示：正常组低于实验组和模型组 ( $P < 0.05$ )；实验组低于模型组 ( $P < 0.05$ )。见表1。

表1 各组小鼠血清TGAb和TPOAb水平比较

( $n=20$ , mIU/L,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	TGAb	TPOAb
正常组	108.32 ± 28.39	1.38 ± 0.25
模型组	297.21 ± 38.41 <sup>①</sup>	2.87 ± 0.56 <sup>①</sup>
实验组	147.54 ± 23.15 <sup>①②</sup>	1.83 ± 0.31 <sup>①②</sup>
F值	39.479	4.983
P值	0.000	0.019

注：①与正常组比较， $P < 0.05$ ；②与模型组比较， $P < 0.05$ 。

### 2.3 各组小鼠淋巴细胞浸润程度比较

正常组、模型组和实验组小鼠淋巴细胞浸润程度分别为 ( $0.28 \pm 0.05$ ) 分、( $3.97 \pm 0.78$ ) 分和 ( $1.83 \pm 0.41$ ) 分，经单因素方差分析，差异有统计学意义 ( $F=6.521$ ,  $P=0.002$ )。进一步两两比较结果显示：正常组低于实验组和模型组 ( $P < 0.05$ )；实验组低于模型组 ( $P < 0.05$ )。

### 2.4 各组小鼠外周血T淋巴细胞亚群变化

正常组、模型组和实验组小鼠 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 和

CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 比较，经单因素方差分析，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。进一步两两比较结果显示：正常组低于实验组和模型组 ( $P < 0.05$ )；实验组低于模型组 ( $P < 0.05$ )。见表2。

表2 各组小鼠外周血T淋巴细胞亚群比较

( $n=20$ , %,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
正常组	2.16 ± 0.39	0.45 ± 0.12
模型组	15.87 ± 2.97 <sup>①</sup>	10.37 ± 1.78 <sup>①</sup>
实验组	8.39 ± 1.86 <sup>①②</sup>	3.15 ± 0.79 <sup>①②</sup>
F值	28.192	16.573
P值	0.000	0.000

注：①与正常组比较， $P < 0.05$ ；②与模型组比较， $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

AT主要包括特发性粘液性水肿、Hashimoto's 甲状腺炎及Grave's病等，其中Hashimoto's 甲状腺炎即慢性淋巴细胞性甲状腺炎<sup>[7-14]</sup>。AT主要是由于机体对甲状腺产生了体液免疫和细胞免疫反应，造成甲状腺功能紊乱<sup>[15-20]</sup>。目前，临床上针对AT患者主要采用西医治疗，但其效果并不十分理想，且会导致患者免疫功能下降。近年来，随着中医药的不断深入研究，其应用于AT患者获得良好疗效，且可增强机体免疫功能<sup>[20]</sup>。

大黄素属一种蒽醌类衍生物，具有清热解毒

功效。药理研究表明, 大黄素具有抑制胰酶活性、免疫调节、抗氧化、改善微循环、保护肝肾、抑菌、抗炎及清除自由基等作用。研究报道显示, 大黄素主要经调节T淋巴细胞亚群间的分化、平衡及其分泌能力, 进一步发挥免疫保护作用<sup>[21]</sup>。本研究结果发现, 与模型组比较, 实验组淋巴细胞浸润程度减轻, 由此可见大黄素可减轻甲状腺组织淋巴细胞浸润程度。TGAb和TPOAb是AT的特征性自身抗体, 通常AT患者表现为血清TGAb和TPOAb水平升高, 并且两者在患者血清中表达是临床诊断AT的重要指标。本研究结果发现, 与模型组相比, 实验组血清TGAb和TPOAb水平降低, 由此可见大黄素可降低血清TGAb和TPOAb水平。

CD4<sup>+</sup>与CD8<sup>+</sup>T细胞是人体免疫系统中重要的免疫细胞, 其中CD4<sup>+</sup>主要表达于辅助T细胞, 并且是Th细胞TCR识别抗原的共受体, 同时与MHC II类分子的非多肽区结合, 从而参与Th细胞TCR识别抗原的信号转导<sup>[22-23]</sup>; 其中CD8<sup>+</sup>主要表达于细胞毒性T细胞上, 并且通过表面的MHC I类分子与CD4等其他免疫细胞的MHC II类分子结合, 识别其他免疫细胞表面结合的抗原物质<sup>[24-25]</sup>。本研究结果发现, 与模型组相比, 实验组CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>和CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>水平下降, 由此可见大黄素可调节免疫平衡。

综上所述, 大黄素可下调AT小鼠血清TGAb和TPOAb, 减轻淋巴细胞浸润程度, 调节小鼠免疫功能。

#### 参考文献:

- [1] GLIGA M C, PASCANU I M, GLIGA C, et al. A prospective study about the influence of selenium based supplements on the autoimmune process evolution and the health-related quality of life in patients with chronic autoimmune thyroiditis[J]. Acta Medica Marisiensis, 2019, 65(3): 97-102.
- [2] 吴朝文, 聂芙蓉, 黎清现, 等. 红曲醇提取物对小鼠自身免疫性甲状腺炎的治疗作用[J]. 广东药科大学学报, 2018, 34(6): 72-76.
- [3] 杨雪威, 王思源, 徐锦江, 等. 运动联合维生素D对实验性自身免疫性甲状腺炎小鼠的保护作用[J]. 东南大学学报(医学版), 2019, 38(2): 323-327.
- [4] KRYSIAK R, KOWALCZE K, OKOPIEN B. The effect of testosterone on thyroid autoimmunity in euthyroid men with Hashimoto's thyroiditis and low testosterone levels[J]. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics, 2019, 44(5): 742-749.
- [5] 祁岗, 朱艳媚, 李玉娟, 等. 基于NF- $\kappa$ B通路研究自身免疫性甲状腺炎发病过程中相关因子的表达变化[J]. 广东医学, 2019, 40(3): 329-334.
- [6] 崇显瑾, 余青原, 阿曼古丽·苏力唐, 等. 地塞米松联合甲状腺素钠治疗对自身免疫性甲状腺炎患者相关血清细胞因子、Th1/Th2相关细胞因子的影响[J]. 疑难病杂志, 2018, 17(11): 1233-1237.
- [7] KYRGIOS I, GIZA S, TSINOPOULOU V R, et al. Seasonality of month of birth in children and adolescents with autoimmune thyroiditis: a continuing conundrum[J]. Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism, 2018, 31(10): 1123-1131.
- [8] 王琳. 温肾方治疗自身免疫性甲状腺炎疗效及对患者血清细胞因子的影响[J]. 陕西中医, 2018, 39(11): 1555-1558.
- [9] MCLACHLAN S M, ALIESKY H A, RAPOPORT B. To reflect human autoimmune thyroiditis, thyroid peroxidase (not thyroglobulin) antibodies should be measured in female (not sex-independent) NOD. H2h4 mice[J]. Clinical & Experimental Immunology, 2019, 196(1): 52-58.
- [10] 董笑克, 吴悠, 郭翔宇, 等. 阳和汤对自身免疫性甲状腺炎模型大鼠辅助性T细胞亚群的影响[J]. 中医杂志, 2018, 59(11): 968-972.
- [11] 高艺洋, 卢一寒, 李静. 自身免疫性甲状腺炎诊治的研究进展[J]. 临床内科杂志, 2018, 35(8): 572-574.
- [12] 叶苗苗, 陈娟, 张丽敏. 地塞米松注射剂联合甲硫咪唑片治疗自身免疫性甲状腺炎患者的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(15): 2196-2198.
- [13] 王晴钰, 盛斯涵, 李俊瑾, 等. 碘化甲状腺球蛋白与自身免疫性甲状腺炎[J]. 中华地方病学杂志, 2019, 38(7): 582-585.
- [14] 王翠英, 任丽萍, 范琳. 补硒治疗对自身免疫性甲状腺炎免疫功能的影响[J]. 解放军医药杂志, 2020, 32(5): 46-48.
- [15] 赵娜, 赵姝洁, 李玉姝. MicroRNA-146参与碘诱导NOD.H-2h4小鼠自身免疫性甲状腺炎[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(10): 1159-1162.
- [16] 金剑虹, 刘国新, 杨成, 等. 复方夏枯草对自身免疫性甲状腺炎大鼠Th1/Th2相关细胞因子的影响[J]. 浙江临床医学, 2019, 21(1): 36-38.
- [17] 李嫚, 涂瑞沙, 余书勇, 等. 夏枯草胶囊对自身免疫性甲状腺炎大鼠NF- $\kappa$ B通路及免疫指标的影响[J]. 解放军医药杂志, 2020, 32(4): 88-92.
- [18] 汪湲, 康志强, 张小芳, 等. 自身免疫性甲状腺炎患者血浆中Th1/Th2细胞及甲状腺自身抗体水平变化及临床意义[J]. 实用医院临床杂志, 2020, 17(1): 154-157.
- [19] 冯颜, 潘秋亚, 项阳, 等. 自身免疫性甲状腺炎血清蛋白质二硫化物异构酶A3抗体的表达[J]. 中国医科大学学报, 2019, 48(1): 12-16.
- [20] 杨娜. 雷公藤提取物对自身免疫性甲状腺炎大鼠血清IL-10、抗体水平及抗氧化能力的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(11): 2744-2747.

- [21] 夏亚男, 李宁, 叶志鹏, 等. 大黄素对实验性自身免疫性甲状腺炎小鼠的免疫保护作用研究[J]. 浙江临床医学, 2018, 20(3): 413-415.
- [22] 金哲, 杨潇, 梅兰, 等. 补气健脾法改善自身免疫性甲状腺炎免疫失衡状态的研究进展[J]. 中国医药, 2018, 13(7): 1114-1117.
- [23] 侯永强, 王新征. 硒酵母胶囊对自身免疫性甲状腺炎大鼠抗氧化能力和免疫失衡的影响[J]. 中华生物医学工程杂志, 2018, 24(6): 386-390.
- [24] 杨潇, 宋囡, 周喜玉, 等. 补气健脾法改善自身免疫甲状腺炎小鼠免疫失常机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(9): 2074-2077.
- [25] 杨潇, 宋囡, 王智民, 等. 补中益气汤通过干预 miR-155 调控 Th17 细胞改善自身免疫甲状腺炎小鼠免疫失常[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(1): 36-40.

(童颖丹 编辑)

**本文引用格式:** 张国平, 李攀, 胡通海, 等. 大黄素对自身免疫性甲状腺炎小鼠的作用机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31(6): 32-36.

**Cite this article as:** ZHANG G P, LI P, HU T H, et al. The mechanisms of emodin in the treatment of autoimmune thyroiditis in mice[J]. China Journal of Modern Medicine, 2021, 31(6): 32-36.