

- [3] Yoshiji H, Noguchi R, Kuriyama S, et al. Imatinib mesylate (STI-571) attenuates liver fibrosis development in rats[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005, 288(5): G907-913.
- [4] GUO SG, Zhang W, Jiang T, et al. Influence of serum collected from rat perfuse with compound Biejia Ruangan drug on hepatic stellate cells [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2004, 10(10): 1487-1494.
- [5] 李万平, 李晓冰, 黄新武, 等. 灵芪薏肝液对肝纤维化细胞外基质的作用研究[J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(9): 2194-2195.
- [6] 李万平, 李晓冰, 黄新武, 等. 灵芪薏肝液对急性肝损伤内毒素和氧自由基的作用[J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(3): 657-658.
- [7] 唐坤华, 陈枫, 邓存良, 等. 灵芪薏肝液抗四氯化碳实验性大鼠肝纤维化的研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2006, 16(20): 3076-3079.
- [8] 刘剑, 李万平, 李晓冰, 等. 灵芪薏肝液对大鼠急性慢性肝损伤影响[J]. *泸州医学院学报*, 2008, 31(1): 29-31.
- [9] Godichaud S, Si-Tayeb K, Auge N, et al. The grape-derived polyphenol resveratrol differentially affects epidermal and platelet-derived growth factor signaling in human liver myofibroblasts [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38: 629-637.
- [10] Borkham-Kamphorst E, Meurer SK, Gressner AM, et al. Disruption of intermolecular disulfide bonds in PDGF-BB dimers by N-acetyl-L-cysteine does not prevent PDGF signaling in cultured hepatic stellate cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 4: 1711-1718.

(编辑: 邓响潮)

含碘中药复方对 AIT 大鼠甲状腺组织凋亡调控蛋白 Fas、FasL、Bcl-2、Bax 的影响

张 兰¹, 邹晓宁², 姜维娜¹, 杨斌婕², 樊程程² (1. 辽宁中医药大学附属医院, 辽宁 沈阳 110032; 2. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110032)

摘要: 目的 观察中药复方中不同剂量含碘中药(海藻、昆布)复方对实验性自身免疫性甲状腺炎(AIT)大鼠甲状腺自身抗体(TGAb、TPOAb)、凋亡调控蛋白 Fas、FasL、Bcl-2、Bax 的影响, 并筛选中药复方中含碘中药的最佳剂量。方法 取 SD 雌性大鼠 75 只, 随机分为正常对照组, 模型组, 含碘中药复方低、中、高剂量组。酶联免疫法检测各组大鼠甲状腺抗体水平; 免疫组化法检测各组大鼠甲状腺组织凋亡调控蛋白 Fas、FasL 和 Bcl-2、Bax 的变化。结果 含碘中药复方各剂量组与模型组比较, 甲状腺自身抗体水平均降低, 甲状腺组织 Fas、FasL、Bax 的表达均减少, Bcl-2 的表达增多, 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 含碘中药复方中、高剂量组与低剂量组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 但中、高剂量组组间比较无明显差异($P > 0.05$)。结论 含碘中药复方能够通过降低甲状腺自身抗体水平, 抑制凋亡调控蛋白 Fas、FasL、Bax 的表达, 增加 Bcl-2 的表达, 起到治疗 AIT 的作用。

关键词: 含碘中药复方; 自身免疫性甲状腺炎; Fas; FasL; Bcl-2; Bax; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)02-0159-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.02.014

Effect of Iodine-Containing Chinese Herbal Recipe on Apoptosis-regulation Protein Fas/FasL and Bcl-2/Bax in Thyroid Tissue of Autoimmune Thyroiditis Rats

ZHANG Lan¹, ZOU Xiaoning², JIANG Weina¹, YANG Binjie², FAN Chengcheng² (Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032 Liaoning, China)

Abstract: Objective To observe the effects of compound recipe having different doses of iodine-containing Chinese herbs(Sargassum and Thallus Laminariae et Eckloniae) on autoantibody and apoptosis-regulated proteins Fas, FasL, Bcl-2, Bax of experimental autoimmune thyroiditis (AIT) rats for the exploration of its therapeutic mechanism, and

收稿日期: 2012-10-06

作者简介: 张兰, 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主任医师, 研究方向: 中西医结合防治糖尿病及其慢性并发症和甲状腺相关疾病。Email: zxn1987118@163.com。

基金项目: 辽宁省自然科学基金计划(20092038)。

to optimize the doses of iodine-containing Chinese herbs in the recipe. **Methods** Seventy-five conventional SD female rats were chosen for the experiment. After 15 rats were taken for the normal group, the left 60 were used for modeling. The model rats were divided into 4 groups, model control group, and low-, middle- and high-dose iodine-containing Chinese herbs groups. Enzyme-linked immunosorbent assay was applied to detect the levels of autoantibody, and immunohistochemical method was used to observe the changes of apoptosis-regulated proteins Fas/FasL, Bcl-2/Bax in the thyroid tissue. **Results** The levels of autoantibodies were lowered, the expression levels of Fas/FasL and Bax were reduced, and the expression level of Bcl-2 was increased in iodine-containing Chinese herbs groups compared with the model control group ($P < 0.01$). The above indexes in high- and middle-dose groups differed from the low-dose group ($P < 0.05$) but the indicators in high- and middle-dose groups showed no obvious difference ($P > 0.05$). **Conclusion** Iodine-containing Chinese herbs can decrease the levels of autoantibody, inhibit the expression levels of apoptosis-regulated proteins Fas, FasL and Bax, and increase Bcl-2 expression, which contributes to its therapeutic effect for AIT. The optimal dose of Sargassum and Thallus Laminariae et Eckloniae is 20 ~ 30 g.

Keywords: Iodine-containing Chinese herbal recipe; Autoimmune thyroiditis; Fas; FasL; Bcl-2; Bax; Apoptosis

自身免疫性甲状腺炎(AIT)属于自身免疫系统紊乱的疾病,其发病机制尚未明确,目前认为凋亡调控蛋白在维持甲状腺组织稳态和清除致敏淋巴细胞等方面发挥着重要作用^[1]。相关凋亡调控蛋白异常表达与本病的发生密切相关。本研究观察中药复方中不同剂量含碘中药(海藻、昆布)对AIT大鼠甲状腺自身抗体及凋亡调控蛋白Fas、FasL、Bcl-2、Bax表达的影响,同时比较分析含碘中药复方治疗AIT疗效的最佳剂量。

1 材料与方法

1.1 动物 普通级SD雌性大鼠75只,4~6周龄,体质量(120 ± 10)g,购于辽宁中医药大学动物实验中心,动物合格证号:SCXK2010-0001。

1.2 仪器 Anthos 2010 酶标仪,奥地利;C4-12 离心机,法国 Jouan 公司;HXP-9052MBE 电热恒温培养箱,上海博讯医疗设备公司;JY5022 电子秤,上海精密仪器有限公司。

1.3 主要试剂 甲状腺球蛋白(TG)、弗氏佐剂,美国 Sigma 公司;甲状腺球蛋白抗体(TGAb)、甲状腺过氧化物酶抗体(TPAb)检测试剂盒,博士德试剂公司;Fas/FasL、Bcl-2/Bax 免疫组化试剂盒,美国 ADL 公司。

1.4 药物 中药复方购于辽宁中医药大学门诊中草药房,由当归、陈皮、茯苓、柴胡、夏枯草、王不留行、浙贝母、海藻、昆布等16味组成,其中含碘中药为海藻、昆布。

1.5 实验方法

1.5.1 动物模型的建立及分组^[2] 大鼠适应性喂养1周,称体质量编号,随机抽取15只作为正常对照组,剩余60只造模。从第2周起正常对照组予以饮

用蒸馏水,造模的大鼠予以饮用高碘水(浓度为0.064%)。第4周起造模大鼠进行初次免疫,由完全弗氏佐剂(CFA)和TG(TG:CFA=1:1)进行充分乳化成药包水状,在双后足皮下进行多点注射2次,间隔2d后再进行1次,每次每只大鼠注射100 μ g。于第5周在背部皮下予以多点注射经不完全弗氏佐剂(IFA)乳化的TG(TG:IFA=1:1),每次每只注射100 μ g,并连续进行4周,作为加强免疫。第8周成模。将成模的大鼠随机分为模型组,含碘中药复方低、中、高剂量组,每组各15只。

1.5.2 给药途径及剂量 模型组及正常对照组灌服等量蒸馏水,含碘中药复方低、中、高剂量组中将海藻、昆布分别按10,20,30 g组成复方(换算成相应的生药剂量为6,20,60 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)灌胃(15 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),每天给药1次,连续灌胃6周。

1.5.3 检测指标及方法 于治疗第45 d在大鼠腹主动脉取血,离心1500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 获取血清,然后采用酶联免疫法检测TGAb、TPOAb;应用免疫组化法检测Fas、FasL、Bcl-2、Bax,并检测相应的灰度值,于光镜下观察免疫组化图片。

1.6 统计学处理方法 采用SPSS13.0统计软件进行数据分析,满足正态性和方差齐性,组间比较用方差分析,所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 各组大鼠光镜下Fas、FasL、Bax、Bcl-2表达的比较 见图1。

2.2 对各组大鼠血清甲状腺自身抗体的影响 见表1。模型组与正常对照组比较TGAb、TPOAb明显升高($P < 0.01$),说明造模成功;与模型组比较,含碘中药复方各治疗组均具有降低AIT大鼠TpoAb、TgAb的

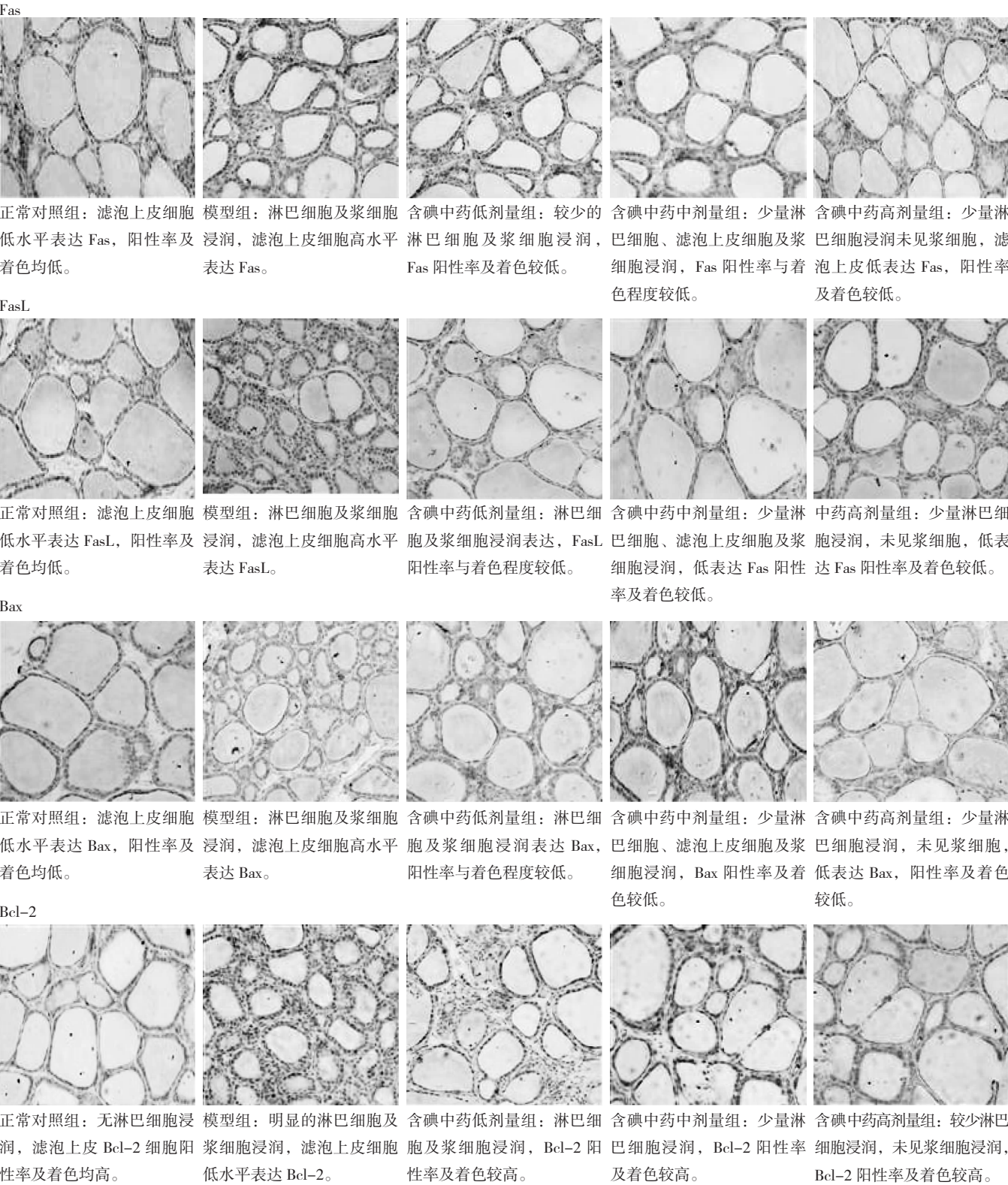


图 1 各组大鼠光镜下 Fas、FasL、Bax、Bcl-2 表达的比较(×400)

Figure 1 The comparison of the rats' Fas, FasL, Bax, and Bcl-2 expression under light microscopyFas(×400)

作用，差异有统计学意义($P < 0.01$)，而中、高剂量组作用优于低剂量组($P < 0.05$)；含碘中药中、高剂量组间比较，差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠甲状腺组织 Fas、FasL 的灰度值比较

见表 2。含碘中药复方各治疗组均有降低 Fas、FasL

的作用($P < 0.01$)，中、高剂量组的作用优于低剂量组($P < 0.05$)，但中、高剂量组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 各组大鼠甲状腺组织 Bax、Bcl-2 的灰度值比较

见表 3。与模型组比较，含碘中药复方各治疗组均具

表 1 各组大鼠血清甲状腺自身抗体变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TPOAb/IU·mL ⁻¹	TGAb/IU·mL ⁻¹
正常对照组	14	0.17 ± 0.05	0.55 ± 0.33
模型组	13	0.40 ± 0.02**	1.63 ± 0.04**
含碘中药复方高剂量组	14	0.26 ± 0.003 ^{##}	1.26 ± 0.02 ^{##}
含碘中药复方中剂量组	14	0.27 ± 0.005 ^{##}	1.34 ± 0.02 ^{##}
含碘中药复方低剂量组	13	0.35 ± 0.01 ^{##}	1.44 ± 0.01 ^{##}

注：与正常对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与含碘中药复方低剂量组比较，[●] $P < 0.05$ 。

表 2 各组大鼠甲状腺组织 Fas、FasL 的灰度值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Fas	FasL
正常对照组	14	120.17 ± 3.58	106.40 ± 4.97
模型组	13	156.32 ± 5.07**	157.21 ± 5.16**
含碘中药复方高剂量组	14	132.23 ± 3.15 ^{##}	122.36 ± 2.49 ^{##}
含碘中药复方中剂量组	14	144.51 ± 1.96 ^{##}	133.75 ± 3.89 ^{##}
含碘中药复方低剂量组	13	147.39 ± 1.34 ^{##}	139.64 ± 3.65 ^{##}

注：与正常对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与含碘中药复方低剂量组比较，[●] $P < 0.05$ 。

表 3 各组大鼠甲状腺组织 Bax, Bcl-2 的灰度值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bax	Bcl-2
正常对照组	14	109.23 ± 4.60	171.63 ± 3.40
模型组	13	156.25 ± 6.18**	108.71 ± 6.29**
含碘中药复方高剂量组	14	124.51 ± 3.87 ^{##}	157.28 ± 5.16 ^{##}
含碘中药复方中剂量组	14	138.82 ± 3.85 ^{##}	141.24 ± 5.08 ^{##}
含碘中药复方低剂量组	13	142.51 ± 3.79 ^{##}	144.69 ± 5.12 ^{##}

注：与正常对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与含碘中药复方低剂量组比较，[●] $P < 0.05$ 。

有提高 Bcl-2、降低 Bax 表达的作用，差异均有统计学意义($P < 0.01$)；其中，中、高剂量组作用优于低剂量组，但中、高剂量组间比较无明显差异。

3 讨论

细胞凋亡是一种形态上有别于细胞坏死的细胞死亡过程。研究发现细胞凋亡参与多种自身免疫性疾病的发病，在 AIT 中，免疫与细胞凋亡的关系密切。Fas 及其配体 FasL 是近年来中外研究最为深入的细胞凋亡的膜表面分子，Fas 是一种跨膜蛋白，它与 FasL 结合可以启动凋亡信号的转导引起细胞凋亡。Bcl-2 家族为另一类凋亡调控蛋白，其中的 Bcl-2 可以抑制细胞凋亡，Bax 可以促进细胞凋亡，细胞凋亡的增加是由于二者的表达比例失衡导致。有研究报道，在 AIT，不仅 Fas 系统介导的细胞凋亡起了重要

作用，还涉及到保护性基因 Bcl-2 的低表达，而 Bcl-2/Bax 比值的下调，可能增加甲状腺滤泡上皮细胞对 Fas/FasL 相互作用的敏感性，从而更促进了甲状腺细胞的凋亡^[3]。因此，从凋亡调控蛋白 Fas/FasL、Bcl-2/Bax 的角度探讨 AIT 的治疗意义比较重大。

本实验所用中药复方是在继承我院名老中医疗本病经验效方基础上，结合多年临床实践总结出的具有健脾补肾、行气化痰、活血软坚功效的中药复方，前期动物实验及临床观察证实其治疗 AIT 疗效确切^[4]。本方主要由当归、陈皮、茯苓、柴胡、夏枯草、王不留行、浙贝母、海藻、昆布等 16 味中药组成。方中的海藻、昆布为含碘中药，是治疗瘰疬的要药，具有化痰软坚之功效，可用于防治缺碘性甲状腺肿。《神农本草经》对海藻的功效有如下叙述：“主瘰疬气，颈下核，破散结气，痈肿癥瘕坚气，腹中上下鸣，下十二水肿。”陶弘景在《名医别录》中对昆布记载如下：“主十二种水肿，瘰疬聚结气，瘰疮。”现代药理学研究^[5]也证实，海藻、昆布中除含碘外，还含有铁、锰、锌等人体必需的微量元素，具有提高人体免疫力等功能。故推测海藻、昆布在本中药复方中可起到一定的治疗自身免疫性甲状腺炎的作用。

虽然海藻、昆布的药用价值已得到了古今的证实，但近年来关于碘摄入过量使甲状腺细胞遭受损伤而导致一系列对甲状腺疾病，尤其是 AIT 发生相关的研究越来越得到大家的重视。由于前期我们应用含碘中药复方治疗 AIT 取得满意疗效，因此有必要进一步探索其疗效机制及方中海藻、昆布的最佳剂量，故以此立题。

本实验研究证实，含碘中药复方能够通过降低甲状腺抗体水平，减少 Fas、FasL 及 Bax 的表达，提高 Bcl-2 的表达而起到有效治疗 AIT 的作用。

参考文献：

[1] Kie JH, Cho MS, Yang Wl. Expression of CD40 and apoptosis related molecules in autoimmune thyroid diseases [J]. Yonsei Med J, 2001, 42: 488-496.

[2] 华川, 陈如泉. 芪苈消癥汤对小鼠甲状腺炎细胞凋亡及超微结构的影响[J]. 医药导报, 2003, 22(9): 594-597.

[3] 武革, 吴雪梅. 自身免疫性甲状腺疾病甲状腺组织中凋亡调控蛋白 Fas/FasL、Bcl-2/Bax 的表达及意义[J]. 临床内科杂志, 2007, 24(11): 763-765.

[4] 程森, 张兰. 软坚消癥汤对 EAT 小鼠血清甲状腺抗体和甲状腺功能影响的实验研究[J]. 光明中医, 2008, 23(8): 1085-1086.

[5] 汪学昭, 寇鹤鸣. 海藻和昆布的微量元素分析[J]. 西北药学杂志, 1995, 10(3): 99-101.

(编辑：邓响潮)