

文章编号: 1001-6325(2021)01-0072-05

α -硫辛酸对自身免疫性甲状腺炎小鼠炎性反应的抑制作用

玛依努·玉苏甫, 衣巴地古丽·库吐鲁克, 哈尼克孜·阿不都艾尼*

(新疆维吾尔自治区人民医院 内分泌科, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要:目的 探讨 α -硫辛酸抑制自身免疫性甲状腺炎(AIT)小鼠炎性反应及对淋巴细胞亚群的影响。方法 将 80 只 NOD.H-2h 4 雌鼠随机分为对照组, 给予无菌双蒸水灌胃; AIT 组给予 50 mg/L 碘化钠无菌双蒸水灌胃; 低及高剂量 α -硫辛酸干预组每天腹腔注射 0.1 和 0.4 g/L α -硫辛酸。每组 20 只, 均持续干预 8 周。干预 8 周后, 用 HE 染色观察淋巴细胞浸润; 采用流式细胞仪检测 Th17、Treg、CD4⁺、CD8⁺ T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺ 水平; 采用 Western blot 测定 p38MAPK、NF- κ B 蛋白水平。结果 AIT 组小鼠甲状腺炎性反应发生率高达 85%。AIT+低/高剂量 α -硫辛酸组小鼠甲状腺炎发生率、甲状腺炎性反应程度评分以及 Th17 细胞比例显著低于 AIT 组 ($P<0.05$); Treg、CD4⁺、CD8⁺ 以及 CD4⁺/CD8⁺ 细胞比例显著高于 AIT 组 ($P<0.05$)。AIT+低/高剂量 α -硫辛酸组的蛋白相对表达水平较 AIT 组明显降低 ($P<0.05$)。结论 α -硫辛酸可以降低 AIT 小鼠炎性反应因子的表达, 改善淋巴细胞亚群的比例, 从而抑制炎性反应和改善 AIT 症状。

关键词: α -硫辛酸; 自身免疫性甲状腺炎; p38 促分裂原活化蛋白激酶(p38MAPK); 核因子- κ B 通路; T 淋巴细胞亚群
中图分类号: R584.1 文献标志码: A

Inhibition of inflammatory response by α -lipoic acid in autoimmune thyroiditis mice

Mayinu YUSUFU, Yibadiguli KUTURUKE, Hanikezi ABUDUAINI*

(Department of Endocrinology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of α -lipoic acid on inflammation in autoimmune thyroiditis (AIT) mice and its effect on lymphocyte subsets. **Methods** Eighty NOD.H-2h 4 female rats were randomly divided into a control group and the AIT group which was given 50 mg/L sodium iodide orally; Low- and high-dose α -lipoic acid intervention group was injected intraperitoneally with 0.1 and 0.4 g/L α -lipoic acid daily. Twenty animals in each group were continued to be intervened for 8 weeks. After 8 weeks of intervention, HE staining was used to observe lymphocyte infiltration; flow cytometry was used to detect Th17, Treg, CD4⁺, CD8⁺ T cells and CD4⁺/CD8⁺ levels; and Western blot method was used to determine p38MAPK and NF- κ B protein level. **Results** The incidence of thyroid inflammation in AIT group was as high as 85%. The incidence of thyroiditis, the degree of thyroid inflammation, and the proportion of Th17 cells in the AIT+low/high-dose alpha-lipoic acid group were significantly lower than those in the AIT group ($P<0.05$), and the proportion of Treg, CD4⁺, CD8⁺, and CD4⁺/CD8⁺ cells were significant higher than that in the AIT group

收稿日期: 2019-11-22 修回日期: 2020-09-08

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2017D01C106)

* 通信作者 (corresponding author): 552483611@qq.com

($P < 0.05$). The AIT+low/high-dose α -lipoic acid group had significantly lower relative protein expression than those in the AIT group ($P < 0.05$). **Conclusions** α -lipoic acid can reduce the expression of inflammatory cytokines in autoimmune thyroid mice, improve the proportion of lymphocyte subsets, thereby suppressing the inflammatory response and improving the symptoms of AIT.

Key words: α -lipoic acid; autoimmune thyroiditis; p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK); NF- κ B pathway; T lymphocyte subset

自身免疫性甲状腺炎 (autoimmune thyroiditis, AIT) 是一种常见的自身器官特异性免疫疾病,其发病机制比较复杂,与遗传、性激素水平、年龄和免疫因素等存在重要联系,且存在多因素协同作用,但其发病机制尚未完全明确^[1]。近年来,研究显示,机体自由基诱发氧化应激损伤与 AIT 发病存在密切联系,并证实抗氧化剂如硒和维生素 E 可改善 AIT 的高易感小鼠的甲状腺炎性反应和 T 淋巴细胞亚群水平^[2]。有研究报道,强效抗氧化剂 α -硫辛酸治疗 AIT 可降低甲状腺相关炎性反应因子水平^[3]。p38 促分裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK) 通路通过激活其下游核转录因子 Kappa B (nuclear transcription factor Kappa B, NF- κ B) 通路可诱导多种炎性反应因子的过度表达,并激活机体炎性反应。已有研究证实,AIT 患者存在 TNF- α 等炎性反应因子高表达,与 NF- κ B 通路间存在正反馈环的相互调控关系,会加剧炎性反应反应^[4]。本研究以 P38MAPK/NF- κ B 通路来研究 AIT 发病机制,分析 α -硫辛酸对 AIT 小鼠的炎性反应及淋巴细胞亚群的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: SPF 级 4 周龄 NOD. H-2h4 雌性小鼠, 80 只, 体质量 18~22 g, 动物来源为广东省医学实验动物中心, 所有动物饲养及实验均经动物伦理委员会批准 (批准文号: 2017D01C106)。

1.1.2 试剂及试剂盒: α -硫辛酸 (Sigma-Aldrich 公司); 兔抗 p38MAPK、兔抗 NF- κ B 和抗 β -actin 抗体 (Arigo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物的分组及处理: 将 80 只 NOD. H-2h4 雌鼠随机分为对照组给予无菌蒸馏水、AIT 组给予 50 mg/L 碘化钠无菌蒸馏水、低剂量以及高剂量 α -

硫辛酸干预组分别每天静脉注射 0.1 和 0.4 g/L α -硫辛酸, 每组 20 只。干预 8 周。

1.2.2 HE 染色检测淋巴细胞浸润: 取各组动物甲状腺组织采取 HE 染色法观察, 比较各组 NOD. H-2h4 雌鼠第 8 周时的甲状腺淋巴细胞浸润发生率以及浸润程度。根据各组动物甲状腺组织切片 HE 染色的淋巴细胞浸润面积大小, 将浸润评分标准^[6]分为 0~4+ 共 5 个等级: 0 表示正常; 1+ 表示 1%~10%; 2+ 表示 10%~30%; 3+ 表示 30%~50%; 4+ 表示超过 50%。

1.2.3 小鼠甲状腺炎性反应程度评分: 当小鼠甲状腺腺体中炎细胞与腺面积比值超过 2%, 表示小鼠发生甲状腺炎。每只小鼠分别取 3 块不连续的甲状腺组织切片后测定, 并取测定平均值作为评分值。

1.2.4 流式细胞仪检测小鼠脾脏 Th17、Treg、CD4⁺ 及 CD8⁺ 等 T 细胞水平: 比较各组小鼠脾脏组织中 Tregs、Th17 细胞比例: 取各组动物脾脏, 匀浆后, 用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞。用含 10% 胎牛血清的培养基重悬细胞; 将其加入培养板中进行孵育, 4 h 后收集细胞, 用 PBS 洗涤细胞后, 用流式细胞仪检测脾脏组织中 Th17、Treg 等辅助性 T 细胞数量比例以及 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞百分比以及 CD4⁺/CD8⁺ 等。

1.2.5 Western blot 检测各组小鼠 p38MAPK、NF- κ B 蛋白水平: 剪取各组小鼠甲状腺组织并经超声裂解, 以 99:1 比例加入裂解缓冲液, 当组织进行充分匀浆后将其静置一段时间, 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清, 用 BCA 法对蛋白进行定量。用 10% SDS-PAGE 对蛋白样品进行分离后, 将蛋白转移到 PVDF 膜上, 用封闭液将样品于室温下封闭 1 h, 按 1 000 倍稀释, 将膜转入封闭液稀释的一抗: 兔抗 p38MAPK、兔抗 NF- κ B、兔抗 β -actin 抗体, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 然后加相应的二抗, 按 1 000 倍稀释, 过夜后使用 PBS 冲洗洗液洗涤, 电化学发光 (ECL) 检测并进行印迹成像。

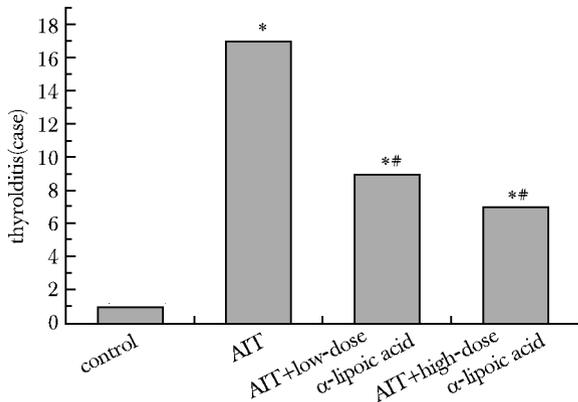
1.3 统计学分析

用SPSS19.0统计分析软件,计量资料以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,分析不同组别各项指标间差异,多组间采用方差分析,组间两两比较采用SNK- q 检验。

2 结果

2.1 各组甲状腺组织学变化

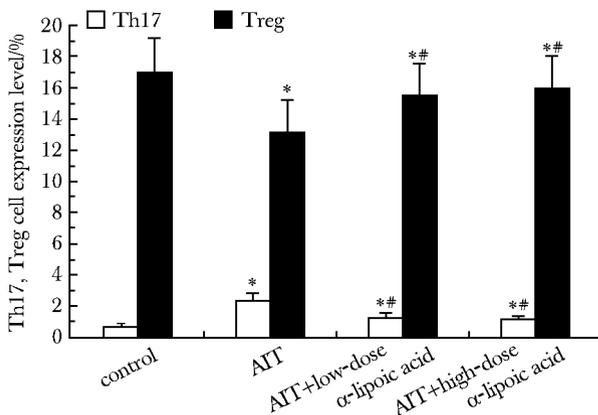
干预8周后,AIT组小鼠甲状腺炎性反应发生率高达85%,AIT+低/高剂量 α -硫辛酸组小鼠甲状腺炎发生率显著低于AIT组($P<0.001$)。干预8周后,AIT+低/高剂量 α -硫辛酸两组小鼠甲状腺炎性反应程度评分相比AIT组均明显下降($P<0.05$)(图1)。



* $P<0.05$ compared with control group; ** $P<0.05$ compared with AIT group

图1 各组甲状腺炎发生率与炎症反应评分比较

Fig 1 Comparison of the incidence and inflammation scores of thyroiditis in each group ($\bar{x}\pm s, n=20$)



* $P<0.05$ compared with control group; ** $P<0.05$ compared with AIT group

图2 各组 Th17、Treg 以及 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞水平比较

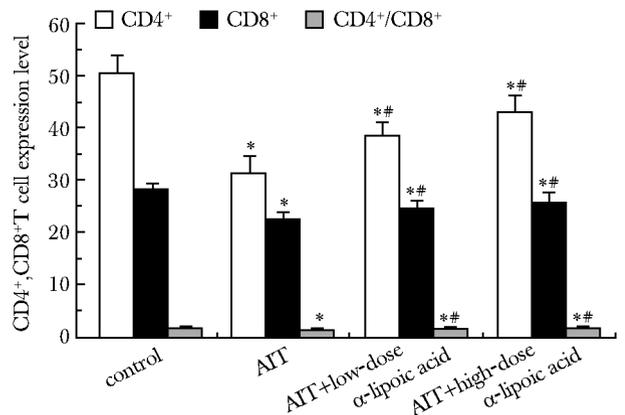
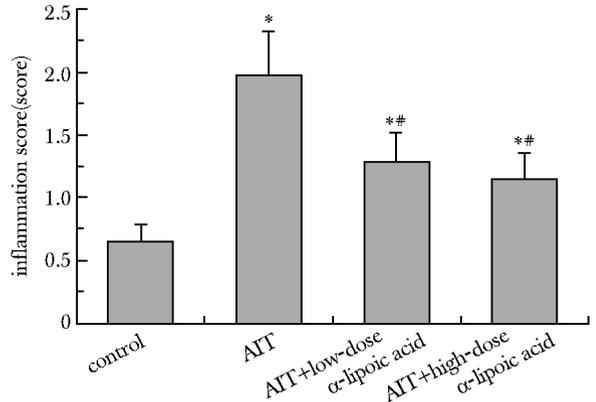
Fig 2 Comparison of Th17, Treg and $CD4^+$, $CD8^+$ T cell levels in each group ($\bar{x}\pm s, n=20$)

2.2 各组 Th17、Treg、 $CD4^+$ 及 $CD8^+$ T 细胞水平比较

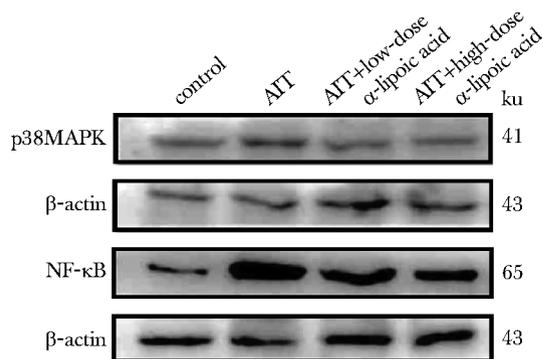
与对照组相比,AIT组小鼠脾组织Th17细胞比例显著升高,而Treg、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 以及 $CD4^+/CD8^+$ 细胞比例显著降低($P<0.05$)。AIT+低/高剂量 α -硫辛酸组小鼠Th17细胞比例相比AIT组显著降低($P<0.05$),Treg、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 以及 $CD4^+/CD8^+$ 细胞比例相比AIT组显著升高($P<0.05$)(图2)。

2.3 各组 p38MAPK 和 NF- κ B 蛋白表达水平的比较

AIT组甲状腺组织p38MAPK和NF- κ B的p38MAPK和NF- κ B蛋白相对表达水平较对照组明显升高($P<0.05$),AIT+低/高剂量 α -硫辛酸两组以上指标表达水平较AIT组和对照组均降低($P<0.05$)(图3)。



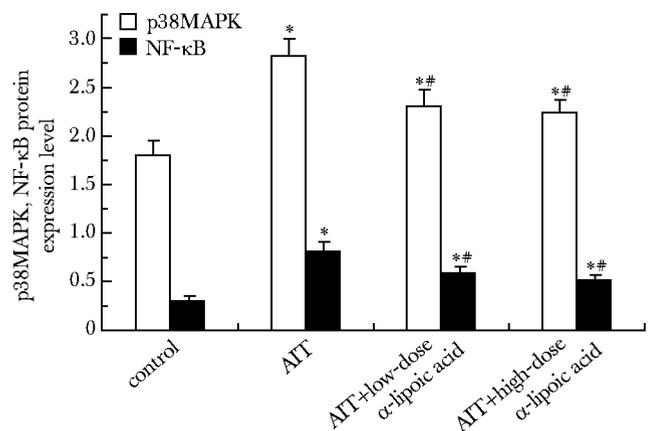
* $P<0.05$ compared with control group; ** $P<0.05$ compared with AIT group



* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with AIT group

图3 Western blot 检测各组 p38MAPK 和 NF- κ B 蛋白水平

Fig 3 Western blot detection of p38MAPK and NF- κ B protein levels in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)



3 讨论

AIT 作为一种自身免疫性疾病,自身免疫因素与该疾病的发生和发展存在紧密联系。T 淋巴细胞作为机体质量要的免疫细胞,一般分为 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞亚群,维持两个 T 淋巴细胞亚群正常水平^[5]。NF- κ B 作为 p38MAPK 的下游信号因子,经磷酸化活化的 p38MAPK 可诱导 NF- κ B 活化至关重要^[6]。以往研究证实 Th17、Treg 作为自身免疫病的重要炎性介质,机体内 IL-17、IL-12 以及 TNF- α 等炎性反应因子水平的升高可以激活 NF- κ B 信号通路,被活化后的 NF- κ B 通路可以促使 T 细胞发生分化,进一步对炎性因子产生正反馈调节,从而放大炎性信号并介导免疫应答的发生^[7]。

研究发现,抗氧化剂在一定程度上可减轻 AIT 小鼠炎性反应水平^[8]。近年研究证实, α -硫辛酸对自身免疫性炎性反应疾病具有保护功能,可通过调节甚至抑制 NF- κ B 信号通路的活化状态以减轻机体的炎性反应^[9]。本文研究结果显示,低/高剂量 α -硫辛酸干预小鼠后的甲状腺炎发生率及甲状腺炎的炎性反应程度评分显著降低,而 Th17 细

胞比例显著升高, Treg、CD4⁺、CD8⁺ 以及 CD4⁺/CD8⁺ 细胞比例显著降低。AIT+低/高剂量 α -硫辛酸组小鼠 Th17 细胞比例相比 AIT 组显著降低, Treg、CD4⁺、CD8⁺ 以及 CD4⁺/CD8⁺ 细胞比例相比 AIT 组显著升高。以上结果提示, α -硫辛酸可有效降低 AIT 小鼠 CD4⁺ 等免疫细胞水平,从而缓解甲状腺炎性反应程度,但高低剂量的 α -硫辛酸之间无显著性差异,可能与样本量较小有关, α -硫辛酸的作用剂量需要深入研究以进一步明确。 α -硫辛酸处理 AIT 小鼠后的血清中 Th17、Th1 和 Treg 类细胞因子(IL-10)达水平均发生明显改善^[10],与本文研究结果相一致,说明 α -硫辛酸可能是通过影响 Th1、Th17、Th22 以及 Treg 等免疫细胞水平,改善 AIT 小鼠的病情。另外,本文研究结果显示,低/高剂量 α -硫辛酸干预小鼠的 p38MAPK、NF- κ B 的蛋白相对表达水平明显较低,这说明 α -硫辛酸可以抑制 p38MAPK 蛋白表达水平^[11]。

综上所述, α -硫辛酸可以通过调控 p38MAPK/NF- κ B 通路,降低自身免疫性甲状腺小炎性反应因子表达,改善淋巴细胞亚群的比例,从而抑制炎性反应反应和改善 AIT 症状。

参考文献:

[1] Nazarpour S, Ramezani TF, Simbar M, *et al.* Effects of levothyroxine treatment on pregnancy outcomes in pregnant

women with autoimmune thyroid disease[J]. *Eur J Endocrinol*, 2017, 176:253-261.

- [2] Medinafernandez FJ, Escribano BM, Agüera E, *et al.* Effects of transcranial magnetic stimulation on oxidative stress in experimental autoimmune encephalomyelitis.[J]. *Free Rad Res*, 2017, 51:460-466.
- [3] Koşar PA, Aşci H, Cğerci IH, *et al.* The effect of alpha-lipoic acid on preventing amikacin-induced DNA damage in rats[J]. *Proct Nat Acad Sci (India)*, 2017, 87:1-7.
- [4] 肖新怀. 香远合剂对桥本氏甲状腺炎大鼠 Th1/Th2 细胞平衡的影响及意义[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 20: 2446-2451.
- [5] 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, 13:1114-1117.
- [6] 祁岗, 朱艳媚, 李焱, 等. NF-κB 通路在自身免疫性甲状腺炎发病过程中的作用[J]. *实用医学杂志*, 2018, 34:46-50.
- [7] 吴炜景, 张家敏, 李立平. TNF-α 诱导 A549 细胞中 NF-κB 与 NOX2 的相关性研究[J]. *临床急诊杂志*, 2017, 23:682-685.
- [8] 张小旭, 任甫. 硒对自身免疫性甲状腺炎大鼠 Nrf2 表达和甲状腺细胞凋亡的影响[J]. *免疫学杂志*, 2018, 45:332-337.
- [9] Lee J, Cho JH. Letter: effects of high-dose α-Lipoic acid on heart rate variability of type 2 diabetes mellitus patients with cardiac autonomic neuropathy in Korea[J]. *Diabetes Metab J*, 2017, 41:417-419.
- [10] 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, 37:38-42+259-260.
- [11] 郭娟, 刘玮, 李胜光. α-硫辛酸的免疫调节作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2018, 23:149-157.