

中药诱导 Graves' 病甲状腺细胞凋亡的初步研究*

赵家军 高 聆 柳欣琦 刘雪萍

内容提要 目的:寻找快速缓解治疗弥漫性甲状腺肿大伴甲状腺功能亢进(Graves'病)的途径。方法:对 13 例 Graves'病患者,加用中药治疗前、后经皮穿刺针吸取甲状腺组织,采用核固红染色观察细胞形态,流式细胞仪检测细胞凋亡的比率,末端标记等方法观察抗甲状腺药物与中药联合应用对 Graves'病的影响。结果:与单纯抗甲状腺药物(A组)治疗比较,患者经抗甲状腺药物与中药联合应用(B组)治疗 2~10 周后,甲状腺组织明显缩小($P < 0.01$);光镜下可见细胞发泡、核着边、核固缩、核小体、核分裂等凋亡细胞的典型形态;加中药治疗前后甲状腺细胞凋亡比率分别为 $(2.11 \pm 1.78)\%$ 和 $(18.66 \pm 20.01)\%$ ($P < 0.01$);末端标记呈阳性。结论:抗甲状腺药物与中药联合应用治疗 Graves'病时可诱导甲状腺细胞凋亡。

关键词 Graves'病 甲状腺 细胞凋亡 中药

Preliminary Study on Chinese Herb Induced Apoptosis of Thyrocytes in Graves' Disease Zhao Jiajun, Gao Ling, Liu Xinqi, et al *Department of Endocrinology, Shandong Provincial Hospital, Jinan (250021)*

Objective: To investigate the cellular and molecular mechanisms of some Chinese herbs on apoptosis of thyrocytes in Graves' disease. **Methods:** Thirteen patients of Graves' disease were treated by anti-thyroid drugs and Chinese herbs were added in the therapeutic period for 2~10 weeks. Thyroid tissue of patient was sucked by percutaneous aspiration before and after adding Chinese herbs for observing the cellular morphology by fast red tablet staining, monitoring the cell apoptotic ratio by flow cytometry and terminal uridine deoxynucleotidyl end labelling (TUNEL) method to observe the effect of anti-thyroid drugs combined with Chinese herbs on Graves' disease. **Results:** Compared with that treated with anti-thyroid drugs alone, after the combined therapy, the size of thyroid decreased significantly, $P < 0.01$. Typical apoptosis appearance, such as vacuolated cell, marginal nuclei, chromatin condensation and nuclear fragmentation, could be seen under light microscopy. The apoptotic rate before and after adding Chinese herbs was $(2.11 \pm 1.78)\%$ and $(18.66 \pm 20.01)\%$ respectively ($P < 0.01$). TUNEL positive cells were detectable for up to 2~20 weeks after Chinese herbal treatment. **Conclusion:** Some Chinese herbs could induce cell apoptosis when used in combination with anti-thyroid drugs in treating Graves' disease.

Key words Graves' disease, thyroid, cell apoptosis, Chinese herbal medicine

弥漫性甲状腺肿大伴甲状腺功能亢进(Graves'病)是一种常见的自身免疫性疾病,目前采用的他巴唑或丙基硫氧嘧啶等治疗,仅能缓解其症状。我们加用调节免疫的中药后,甲状腺肿大及突眼等症状迅速缓解。

资料与方法

1 临床资料 Graves'病患者根据全国高等医学院校教材《内科学》(第 3 版)诊断标准诊断,临床及实验室检查均符合 Graves'病诊断。13 例患者中男 4 例,女 9 例;年龄 24~60 岁,平均 (23.6 ± 15.2) 岁;病程

1~13 年,平均 (3.7 ± 2.9) 年;长期或间歇服用他巴唑或丙基硫氧嘧啶。

2 治疗方法 13 例患者在本院经单纯抗甲状腺药物(他巴唑或丙基硫氧嘧啶, A 组)治疗 2~10 周,加用中药治疗(B组)2~10 周。

中药由三棱 15g 黄芪 30g 女贞子 15g 莪术 12g 薏苡仁 20g 甘草 6g 等组成,每天 1 剂,水煎后分早晚两次服用。他巴唑 5~15mg,或丙基硫氧嘧啶 50~150mg,每天 3 次口服。症状缓解,甲状腺功能正常后逐渐减量,每次减 1/3 量。A 组治疗 2~10 周及 B 组治疗 2~10 周时,采用彩色多普勒超声测量甲状腺大小并穿刺,获得的甲状腺组织部分涂片,其余的做流式细胞仪检查。

3 检测方法

*本课题受山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助(No. 96384222)

3.1 细胞形态学检查 组织涂片后,甲醛、冰醋酸等固定 30min,酒精脱色,1%核固红 10min,1%结晶紫 30min 染色,95%酒精(含苦味酸)分色,然后按常规病理切片处理。

3.2 流式细胞仪检测 将穿刺获得的甲状腺组织细胞,置于 2% EDTA 用 400 目筛网过滤 2 次。制备的单细胞悬液用 70% 乙醇固定,4℃ 过夜。次日生理盐水洗脱液洗涤去除固定液。加 PI 染液混匀,至 4℃ 避光 30min,上机测试。正常对照细胞呈红色荧光,凋亡细胞呈蓝色荧光,在流式细胞仪 DNA 直方图上,由于凋亡细胞的出现,二倍体细胞(G 细胞)减少,G₁ 峰左侧出现亚二倍体细胞群的峰型(即凋亡细胞峰)。

3.3 原位末端标记(TUNEL) 试剂购自德国宝

表 1 加用中药前后甲状腺径线的变化比较 (cm, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	右叶			左叶		
		上下径	右左径	前后径	上下径	右左径	前后径
A	13	6.42 ± 1.51	3.35 ± 0.94	2.66 ± 0.51	6.37 ± 1.12	3.32 ± 0.87	2.63 ± 0.66
B	13	5.02 ± 0.91*	2.39 ± 0.52*	2.11 ± 0.49*	4.30 ± 0.80*	2.28 ± 0.55*	2.10 ± 0.46*

注:与 A 组比较,* $P < 0.01$

物治疗组甲状腺细胞核较均匀;加用中药治疗后某些细胞出现发泡、核着边、核固缩、核碎裂、核小体,凋亡细胞数明显增加。

3 流式细胞仪检测结果 单纯应用抗甲状腺药物治疗组细胞凋亡比率为(2.11 ± 1.78)%;中药加抗甲状腺药物治疗后甲状腺细胞凋亡比率为(18.66 ± 20.01)%,两者比较有显著性差异($P < 0.01$)。

4 原位末端标记 中药与抗甲状腺药物联合治疗后可见呈蓝色的阳性细胞;单纯用抗甲状腺药物治疗组镜下未见阳性细胞。非凋亡细胞的细胞核经核固红复染呈红色,核相对较大,形态大小较为一致。

讨 论

细胞凋亡是单个细胞受内在基因编程的调节,通过主动的生化过程而自杀死亡的现象。并与细胞识别和信号传递有关,抗体、淋巴因子、药物等均可能影响细胞凋亡的变化。因此对细胞凋亡的研究已从生物学发展到肿瘤学及临床医学等。

研究凋亡的方法很多,形态学中核分裂、核小体出现为主要指标,流式细胞仪以定量的方式确定细胞内总 DNA 量变化是被广泛应用的方法⁽¹⁾,但上述两种方法对凋亡细胞内部发生的本质变化却不能反应。细胞凋亡时,DNA 从核小体间断裂成 180~200bp 的核苷酸链,断裂产生一粘性末端⁽²⁾。该实验选用具有特异

灵曼公司。将涂片置于新配制的冷 4% 多聚甲醛 PBS (pH7.4)30min RT 下,PBS 冲洗。0.1% 曲拉通 X-100 透膜(冰浴),乙酸阻断内源性碱性磷酸酶 15s。加 TUNEL 酶及标记物,PBS 洗片 3 次,加碱性磷酸酶,置 37℃ 湿盒 30min,加碱性磷酸酶底物 BCIP/NBT(暗室),核固红复染,水溶性封片,拍照,光镜下观察。

4 检验方法 采用秩和检验, t 检验。

结 果

1 加用中药前后甲状腺径线变化比较 见表 1。与单纯应用抗甲状腺药物的 A 组比较,用中药与抗甲状腺药物联合治疗 2~10 周的 B 组后,甲状腺三条径线明显缩小。

2 形态学观察 光镜下发现,单纯用抗甲状腺药

性敏感度高的末端标记方法,避免了坏死细胞及 X 线损伤细胞 DNA 随机断端被 DNA 多聚酶标记造成的假阳性⁽³⁾。伴随着对凋亡细胞的研究,国外利用其对甲状腺疾病的研究逐渐增多⁽⁴⁾,国内尚未见报道。他巴唑或丙基硫氧嘧啶治疗 Graves' 病的主要作用是抑制甲状腺激素合成,对明显肿大的甲状腺组织很难缩小,我们发现加用调节免疫功能及软坚的中药后,在甲状腺激素明显降低的同时,患者的甲状腺明显缩小,在较短的时间内取得理想的疗效。此结果与药物诱导细胞凋亡有关,其分子机制我们正做进一步研究。

参 考 文 献

1. Watson RW, Rotstein OD, Nathens AB, et al. Thiol-mediated redox regulation of neutrophil apoptosis. Surgery 1996;120(2): 150—158.
2. Tsujitani S, Shirai H, Tatebe S, et al. Apoptotic cell death and its relationship to carcinogenesis in colorectal carcinoma. Cancer 1997; 77(8 suppl):1711—1716.
3. 李 林主编.抗癌药物研究与实验技术.北京:北京医科大学与中国协和医科大学联合出版社,1997:389—403.
4. Kotani T, Aratake Y, Hirai K, et al. Apoptosis in thyroid tissue from patients with Hashimoto's thyroiditis. Autoimmunity 1995; 20(4):231—236.

(收稿:1998-12-29 修回:1999-03-10)