

· 基础研究 ·

甲亢宁胶囊含药血清对 M22 刺激 FRTL-5 细胞增殖的影响及自噬在其中的作用

魏军平 郑慧娟 李敏 王秋虹 魏璠 柏力苒 陈舒雅

摘要 **目的** 探讨甲亢宁胶囊含药血清对甲状腺刺激性抗体(TSAb)单克隆抗体 M22 刺激 Fisher 大鼠甲状腺细胞系(FRTL-5)增殖作用和自噬的影响。**方法** 体外培养 FRTL-5 细胞,采用不同浓度及时间观察 M22 刺激细胞增殖的量效关系,并确定作用最佳浓度及时间并制备甲亢宁胶囊含药血清。将 FRTL-5 细胞分为模型组(M22 刺激 24 h + 15%空白大鼠血清),中药低、中、高剂量组(M22 刺激 24 h 后 5%、10%、15% 甲亢宁胶囊含药血清干预 24 h),正常组(15%空白大鼠血清)。采用 CCK8 法、酶联免疫竞争法检测各组细胞增殖情况及上清液中 cAMP 水平。确定高剂量(15%)甲亢宁胶囊含药血清抑制细胞增殖作用最强后再将 FRTL-5 细胞分为正常组(15%空白大鼠血清)、模型组(M22 刺激 24 h + 15%空白大鼠血清)和中药组(M22 刺激 24 h 后 15% 甲亢宁胶囊含药血清干预 24 h),透射电镜下观察各组细胞内自噬体的变化,Western blot 检测各组细胞自噬相关 LC3 及 Beclin1 蛋白水平。**结果** M22 对 FRTL-5 细胞的增殖影响呈现明显量效关系,确定 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ M22 于 24 h 增殖作用最佳。与正常组比较,模型组 FRTL-5 细胞增殖活性明显增强($P < 0.01$),细胞上清液中 cAMP 释放量增加($P < 0.01$),自噬相关蛋白 LC3 II/I 和 Beclin1 表达减少($P < 0.01$);与模型组比较,中药中剂量组和高剂量组 FRTL-5 细胞增殖被抑制($P < 0.01$),上清液中 cAMP 释放量减少($P < 0.05$, $P < 0.01$),中药低剂量组作用差异无统计学意义($P > 0.05$),中药组自噬关键蛋白 LC3 II/I、Beclin1 表达均增高($P < 0.01$)。透射电镜提示,模型组较正常组自噬小体的数量减少,而中药组较模型组增多。**结论** M22 可促进 FRTL-5 细胞增殖且导致细胞自噬异常,而中药甲亢宁胶囊可通过改善其自噬异常,进而发挥抑制 FRTL-5 细胞增殖的作用。

关键词 甲亢宁胶囊; Graves 病; M22; FRTL-5 细胞; 细胞自噬; 自噬相关蛋白

Effect of Jiakangning Capsule Containing Serum on M22-induced Proliferation of FRTL-5 Cells and the Role of Autophagy in it WEI Jun-ping, ZHENG Hui-juan, LI Min, WANG Qiu-hong, WEI Fan, BAI Li-tao, and CHEN Shu-ya Department of Endocrinology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100053)

ABSTRACT **Objective** To investigate the effect of a serum containing Jiakangning (JKN) capsule on the proliferation and autophagy of Fisher rat thyroid (FRTL-5) cell line stimulated by monoclonal thyroid-stimulating antibody (TSAb) M22. **Methods** FRTL-5 cells were cultured *in vitro*. The dose-effect relationship of M22 on stimulation of cell proliferation was observed and recorded for different concentrations and time periods. The FRTL-5 cells were divided into model group (M22 stimulation for 24 h + 15% serum of healthy rats), low, medium and high JKN groups (M22 stimulation for 24 h + administration of 5%, 10%, and 15% JKN for 24 h, respectively) and normal group (15% serum of healthy rats). The CCK8 and enzyme-linked immunosorbent assays were used to detect cell proliferation and cAMP level in the supernatants, respectively. It was determined that the highest dose (15%) of JKN had the strongest inhibitory effect on cell proliferation; therefore, FRTL-5 cells in this group were further divided into normal

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 81573961)

作者单位: 中国中医科学院广安门医院内分泌科(北京 100053)

通讯作者: 魏军平, Tel: 010 - 88001246, E-mail: weijunping@126.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20180630. 246

group (15% serum of healthy rats), model group (M22 stimulation for 24 h + 15% serum of healthy rats) and JKN-administered group (M22 stimulation for 24 h + administration of 15% JKN for 24 h). Autophagy was then observed using a transmission electron microscope, while autophagy-related LC3 and Beclin1 protein levels were detected by Western blot. Results The effect of M22 on the proliferation of FRTL-5 cells showed a significant dose-effect relationship; it was determined that cell proliferation activity was most obvious when 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ M22 co-cultured FRTL-5 cells for 24 h. Compared with the normal group, the proliferation activity of FRTL-5 cells in the model group was significantly higher ($P < 0.01$) along with an increased release of cAMP in the cell supernatant ($P < 0.01$) and decreased expression of autophagy-related proteins ($P < 0.01$). Compared with the model group, the proliferation of FRTL-5 cells was inhibited at medium and high doses JKN ($P < 0.01$), while the release of cAMP in the supernatant decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the group administered with the low dose did not show a statistically significant decrease ($P > 0.05$), the expression of the aforementioned autophagy-related proteins increased in the JKN-administered group ($P < 0.01$). Transmission electron microscopy showed that the number of autophagic corpuscles in the model group decreased as compared to that in the normal group, while the number of autophagic bodies in the JKN-administered group increased as compared to that in the model group. Conclusions M22 promotes the proliferation of FRTL-5 cells because of abnormal autophagy. Administration of JKN capsule can inhibit the proliferation of FRTL-5 cells by improving the capability of cells to undergo autophagy.

KEYWORDS Jiakangning Capsule; Graves disease; M22; FRTL-5 cells; cell autophagy; autophagy-related protein

Graves 病 (Graves Disease, GD) 又称毒性弥漫性甲状腺肿, 是引起甲亢最常见的原因, 约 3% 的女性和 0.5% 的男性会患有 GD^[1]。随着环境污染加重、生活节奏加快及人们压力加大, GD 的发病率呈上升趋势, 影响患者的身心健康和生活质量^[2]。研究认为, GD 主要是由于遗传因素、环境因素、精神创伤等诱发的免疫紊乱, 产生的促甲状腺激素 (thyroid stimulating hormone, TSH) 受体抗体 (thyrotropin receptor antibody, TRAb) 持续激活甲状腺细胞膜上促甲状腺激素受体, 进而激活腺苷酸环化酶, 使甲状腺细胞内环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 含量增加, 从而促进甲状腺细胞增殖, 导致甲状腺激素合成、分泌增加^[3]。本课题组前期研究发现, 中药甲亢宁胶囊能明显降低 GD 模型小鼠 TRAb 和 T4 水平改善甲状腺肿大其作用可能是通过 Akt/mTOR 信号通路介导甲状腺细胞的增殖抑制和促凋亡^[4]。通过体外验证实验说明甲亢宁胶囊可通过调控 TSH 受体胞内信号通路 ERK1/2 和 mTOR 抑制甲状腺细胞的增殖^[5,6]。而甲亢宁胶囊干预甲状腺细胞的增殖机制是否与自噬活性有关目前尚未见报道。故本研究在前期内外实验的基础上, 进一步优化方案, 采用甲状腺刺激性抗体 (thyroid stimulating antibody, TSAb) 的单克隆抗体 M22 刺激 Fisher 大鼠甲状腺细胞系 (Fisher rat thyroid cell line, FRTL-5), 建立体外研究 GD 甲状腺细

胞增殖模型, 从形态学观察和自噬标记蛋白检测方面观察中药甲亢宁胶囊含药血清对 M22 诱导的甲状腺增殖细胞自噬的影响, 从而探讨甲亢宁胶囊可能的作用机制, 为中药甲亢宁胶囊在甲状腺自身免疫性疾病治疗中的应用提供实验依据。

材料与方法

1 动物与细胞 SPF 级 SD 雄性大鼠 25 只, 8 周龄, 体重 (250 \pm 20) g, 动物购自北京维通利华实验动物中心, 合格证号: SCXK (京) 2012 - 0001。FRTL-5 细胞株来源于美国细胞培养库 (American Type Cell Culture, ATCC), 货号 CRL-1468。

2 药物及主要试剂 甲亢宁胶囊 (批号: 20130514, 中国中医科学院广安门医院研制, 0.45 g/粒, 主要成分: 牡蛎、玄参、连翘、半夏、夏枯草、山慈菇、土贝母、土茯苓); M22 (RSR-TSHR hMAb, M22/FD/0.04, Cardiff 公司, 英国); Ham's F12 培养基 (美国 ATCC, 30-2004); 0.25% 胰酶含 EDTA (杭州吉诺生物医药技术有限公司, 15110601); 青链霉素 (美国 HyClone, SV30010); PBS 缓冲液 (美国 HyClone, AB10111039); FBS (美国 Gibco, 10099-133); 氢化可的松 (美国 Sigma 公司, H0888); 胰岛素 (日本 Wako, 093-06471); 转铁蛋白 (美国 Sigma 公司, T0665); 生长抑素 (美国 Sigma 公司, s-

0885); 甘氨酸-组氨酸-赖氨酸乙酸盐(美国 Sigma 公司, G7387); TSH (美国 Merck Millipore 公司, 609385); CCK-8 (日本 Dojindo 公司, KH825); cAMP 环磷酸腺苷活性检测试剂盒(美国 Biovision 公司, K371-100); 2.5% 戊二醛(北京 Solarbio 公司, P1126); LC3 抗体(日本 CST, 12741), Beclin-1 抗体(日本 CST, 3495S), β -actin (TA-09, 中山金桥生物技术有限公司)。

3 主要仪器 二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司, 06198)、荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司, Ti-U)、离心机(北京白洋公司, 600A)、超净台(YZB 京/京 0024-2005)、STAT FAX 2100 全自动酶标仪(美国 Awareness Technology Inc.)一次性细胞计数板(德国 Eppendorf 公司)、全自动酶标仪(美国 Biotek 公司, ELX800)、移液器(德国 Eppendorf 公司, 3120000.267)。

4 实验含药血清的制备 SD 大鼠 25 只适应性喂养 1 周,按体重进行分层后放于 5 个不同鼠笼内,每个笼内随机抓取 2 只作为空白血清组($n=10$)、剩余 3 只作为甲亢宁胶囊含药血清组($n=15$)。甲亢宁胶囊含药血清组按前期动物实验^[7]的有效剂量 1.5 g/kg,根据中药药理学研究方法,将甲亢宁胶囊混悬液灌胃,给药 2 次/天,空白血清组给予等量生理盐水溶液,连续灌胃 3.5 天,于末次给药 1 h 后,10%的水合氯醛麻醉,于腹主动脉采血。室温静置 2 h, 3 000 r/min 离心 15 min,于超净台内用移液枪取血清,置于 56 °C 水浴 30 min 灭活,于 0.22 μ m 微孔滤器过滤除菌,分装于 1.5 mL EP 管中,保存于 -80 °C 中备用。

5 细胞培养 FRTL-5 细胞生长于 F'12K 完全细胞培养液(F'12K 培养基中含有 10 mU/m TSH、0.01 mg/mL 胰岛素、10 nmol/L 氢化可的松、0.005 mg/mL 转铁蛋白、10 ng/mL 生长抑素、10 ng/mL 乙酸盐、5% FBS、1% 青链霉素)中,将 25 cm² 培养瓶放于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养,此细胞不易贴壁,前 48 h 不要移动。于 48 h 后显微镜下观察细胞贴壁情况,根据细胞贴壁情况约 48~72 h 间换液。2 天换液 1 次,约 5~7 天,当细胞生长至 80% 以上时用 0.25% 含 EDTA 的胰酶消化,按 1:2 比例传代于带滤孔的 25 cm² 培养瓶中。

6 CCK8 法检测细胞增殖-抑制实验 将 M22 溶解于无菌的 PBS 或灭菌水中。制备实验所需细胞悬液,细胞计数后稀释至 2 \times 10⁵/mL 接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L 细胞悬液,每样本 10 个重复。经细胞前期处理后,加入倍比稀释后的 M22 (0、0.125、

0.25、0.5、1、2 μ g/mL)于完全细胞培养液中,分别作用于不同时间(1、3、6、12、24、48、72 h)后,每孔加入 10 μ L 的 CCK8 液,在培养箱内孵育 2 h,于酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度值(OD)。确定 M22 刺激 FRTL-5 细胞增殖的最佳浓度和时间。

7 干预前处理及分组 选择生长状态良好、处于对数生长期的 4~10 代 FRTL-5 细胞用 0.25% 胰酶消化后,以 6 \times 10⁵ 个/孔密度接种于 6 孔板,于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养 48 h 后,待细胞完全贴壁、细胞生长至 60%~70% 时换用不含 TSH 的培养液培养 48 h,继之更换含 0.3% FBS、不含 TSH 的培养液继续培养 24 h,使 FRTL-5 细胞生长同步于 G₀ 期。将培养板中的 FRTL-5 细胞分为正常组和模型组,模型组给予以 M22 刺激 24 h,正常组予同等剂量 PBS 做对照,在模型建立的基础上给予甲亢宁胶囊含药血清干预,分组如下:(1)正常组:15% 空白大鼠血清;(2)模型组:15% 空白大鼠血清;(3)中药高剂量组:15% 甲亢宁胶囊含药血清;(4)中药中剂量组:10% 甲亢宁胶囊含药血清 + 5% 正常大鼠血清;(5)中药低剂量组:5% 甲亢宁胶囊含药血清 + 10% 正常大鼠血清。作用时间为 24 h,每组设 6 个复孔。采用荧光倒置显微镜 200 倍镜下观察 FRTL-5 细胞的形态学变化;再于每孔加入 10 μ L CCK8 液培养 2 h,于 450 nm 波长检测各孔的 OD。

8 酶联免疫竞争法检测细胞上清液中 cAMP 释放量 FRTL-5 细胞接种于 96 孔板中,经干预后收集各组的细胞上清液 100 μ L 于 EP 管中。按照试剂盒,标准品稀释,每孔加入抗体 100 μ L 包被 2 h,弃掉液体甩干,每孔加稀释后洗涤液 300 μ L,震荡 30 s,洗去洗涤液,重复 5 次。每孔加入包被液 25 μ L,标本 25 μ L,标准品 50 μ L,晃动混匀,每孔加入 HRP 100 μ L 混匀,室温静置 60 min。弃液甩干,每孔加洗涤液 300 μ L,震荡 30 s,重复 5 次。每孔分别加入显色液 100 μ L 15 min,终止液 100 μ L 终止反应,在 450 nm 波长下测定各孔的吸光度值。

9 透射电镜观察细胞自噬体超微结构 经实验 7.8,确定高剂量(15%)甲亢宁胶囊含药血清抑制细胞增殖作用最强。故进一步观察高剂量甲亢宁胶囊含药血清抑制甲状腺细胞增殖过程中对自噬活性的影响,将 FRTL-5 经处理后,分组如下:正常组、模型组和中药组。收集各组细胞 1 mL PBS 重悬细胞后转移至 1.5 mL EP 管中,采用 3 500 r/min \times 5 min 离心后弃掉上清,沿侧壁轻轻加入 1 mL 2.5% 戊二醛,4 °C 中固定 2 h。PBS 漂洗 3 次,加入 4 °C 预冷的 1% 锇酸固定 1 h 后,丙酮脱水、树脂包埋,超薄切片,

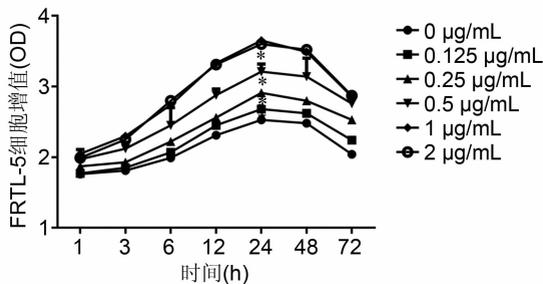
使切片厚度保持在 50 ~ 70 nm, 经乙酸双氧铀和枸橼酸铅双染色后, 用透射电镜观察。

10 Western blot 法检测自噬蛋白 LC3 II/I 和 Beclin1 的表达 通过透射电镜初步观察到自噬形成过程中自噬体的变化, 进一步观察自噬体形成标记蛋白表达水平, 实验分组同方法 9。各组细胞经干预前处理后, 用蛋白裂解液抽提蛋白, 12 000 ×g 离心 15 min 后取上清, 保存于 -80 °C 中。按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明测定蛋白浓度。经蛋白定量后, 每组取 2 μg/μL 蛋白进行 SDS - PAGE 电泳分离, 移至 PVDF 膜后, 用丽春红试剂对膜进行染色, 观察转膜效果。将膜浸没于 5% BSA-TBST 中, 脱脂奶粉封闭 1.5 h 后, 加入 1:1 000 倍比稀释的一抗 LC3 和 Beclin 1, 4 °C 过夜。次日, TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min, 再滴加适当稀释的二抗, 孵育 40 min, TBST 洗膜 3 次后 ECL 滴加到膜的蛋白面, 反应 3 min, 胶片曝光, 定影后凝胶成像进行系统分析。

11 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。所测数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。服从正态分布且方差齐者采用单因素方差分析, 两两比较用 LSD 或 T 检验; 不服从正态分布者, 采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。作图使用 Graph Pad Prism 5 软件。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 不同浓度及时间 M22 刺激 FRTL-5 细胞增殖情况(图 1) 随着时间延长 M22 干预的细胞增殖不断增加, 至 24 h 时达到最大值。各浓度比较, 随着浓度的增加细胞的增殖逐渐增强, 在 24 h 时 1 μg/mL 浓度 M22, FRTL-5 细胞增殖显著大于 0.5、0.25、0.125、0 μg/mL (P < 0.01); 与 2 μg/mL 比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05)。



注: 与 1 μg/mL 比较, *P < 0.01

图 1 M22 刺激 FRTL-5 增殖的时效、量效关系

2 甲亢宁胶囊含药血清对 FRTL-5 细胞增殖的影响(图 2,3) 正常组 FRTL-5 细胞呈扁平不规则多

角形, 有聚集生长的特点, 个别细胞团聚集发亮; 模型组细胞密度较大, 形态饱满, 立体感较强; 经甲亢宁胶囊含药血清干预后, 细胞团聚集发亮部位增多, 细胞增殖被抑制, 凋亡细胞增加, 密度减少。CCK8 结果显示, 与正常组比较, 模型组 FRTL-5 细胞增殖明显增加 (P < 0.01); 与模型组比较, 中药中剂量和高剂量组 FRTL-5 细胞增殖明显被抑制, OD 值显著下降 (P < 0.01), 中药低剂量组略微降低, 但差异无统计学意义 (P > 0.05)。

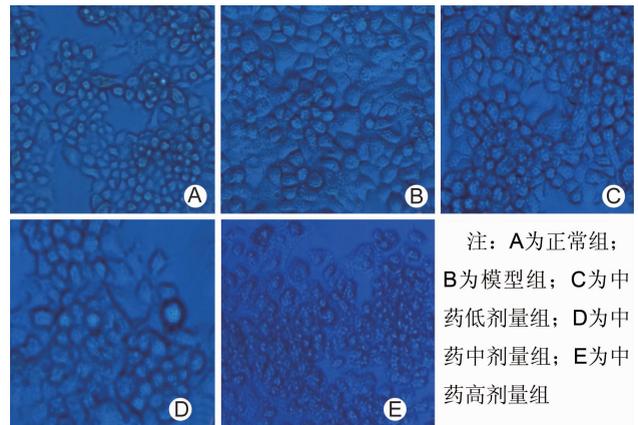
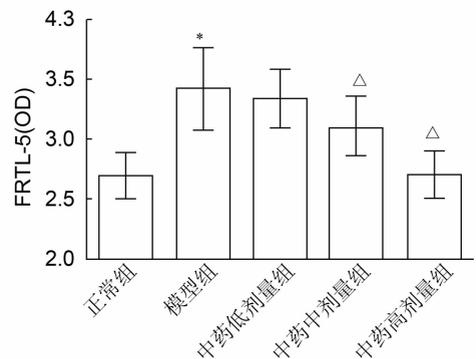


图 2 各组 FRTL-5 细胞形态学变化 (×200)

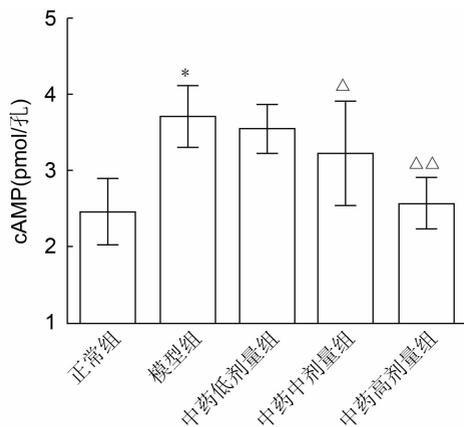


注: 与正常组比较, *P < 0.01; 与模型组比较, ^ΔP < 0.01

图 3 各组 FRTL-5 细胞增殖 - 抑制变化

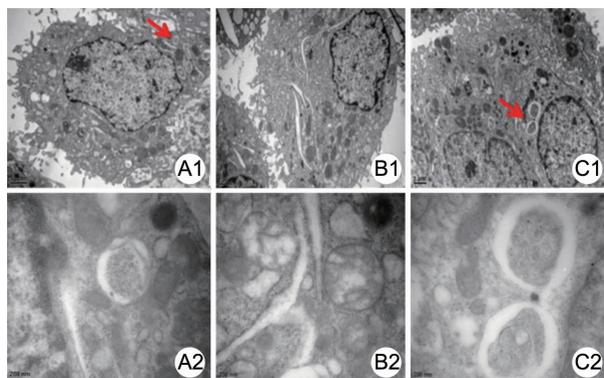
3 各组 FRTL-5 细胞上清液中 cAMP 释放量表达水平比较(图 4) 与正常组比较, M22 刺激 FRTL-5 细胞 24 h 后, 模型组细胞 cAMP 释放量明显升高 (P < 0.01)。与模型组比较, 中药中剂量和高剂量组 FRTL-5 细胞的 cAMP 释放量降低 (P < 0.05, P < 0.01); 而中药低剂量组差异无统计学意义 (P > 0.05)。

4 各组 FRTL-5 细胞自噬体超微结构变化(图 5) 透射电镜观察, 与正常组比较, 模型组细胞浆内出现大量空泡状结构, 内质网丰富、扩张, 线粒体增大,



注:与正常组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

图4 各组 FRTL-5 细胞上清 cAMP 释放量



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为中药组;箭头所指为自噬体结构;1 放大倍数为 $\times 12\ 000$; 2 放大倍数为 $\times 60\ 000$

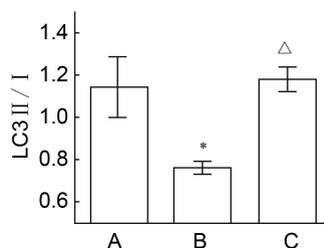
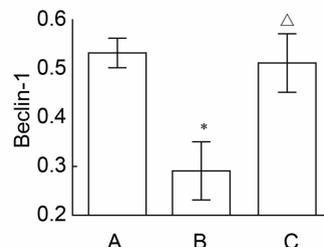
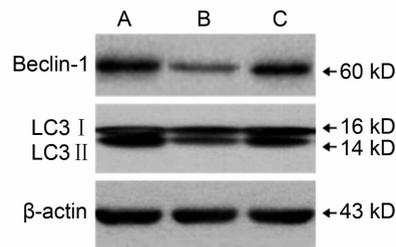
图5 各组 FRTL-5 细胞内自噬体的超微结构变化

而自噬小体的数量少;与模型组比较,中药干预后 FRTL-5 细胞内自噬体双层膜包绕的球状结构及自噬溶酶体明显增多。提示中药甲亢宁胶囊可以诱导 FRTL-5 增殖细胞自噬体的形成。

5 各组 FRTL-5 细胞中自噬形成蛋白 LC3、Beclin1 的变化(图 6) 与正常组比较,模型组 FRTL-5 细胞自噬关键蛋白 LC3 II/I、Beclin1 表达均显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,中药组自噬关键蛋白 LC3 II/I、Beclin1 表达均增高($P < 0.01$)。

讨论

GD 属中医学“瘰病·瘰气”范畴,认为其发病与情志内伤、饮食水土失宜、体质等因素有关,多由肝郁化火,久则伤阴耗气形成虚实夹杂之证,其中以阴虚、气虚为本,气滞、痰凝、血瘀为标^[8]。中药甲亢宁胶囊是由中国中医科学院广安门医院林兰教授研制治疗 GD 的药物^[9]。选用生牡蛎咸寒入肝肾,具有滋阴潜



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为中药组;与正常组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

图6 各组 FRTL-5 细胞 LC3、Beclin1 蛋白表达

阳、软坚散结的作用;玄参苦甘、咸寒入肾,滋阴生津,阴液足则阳自潜;连翘、夏枯草有清肝泻火、化痰散结之功,针对痰凝之病机。诸药合用,共奏滋阴潜阳、化痰散结、标本兼治之功,通过对整体功能的调节,可改善 GD 患者临床症状、减轻抗甲状腺药物的副作用、缩短病程、防止甲亢复发等^[10,11]。

TRAb 是 GD 的致病性自身抗体,而 TSAb 是 TRAb 的一种,是诊断 GD 发生的敏感、特异性生物学标志物,且与疾病的严重程度及复发相关^[12,13],TSAb 通过竞争性结合甲状腺细胞膜上的 TSH 受体 A 亚单位,模拟 TSH 的生物学效应,引起细胞内 cAMP 水平增加,从而促进甲状腺滤泡细胞过度增殖,分泌过多的甲状腺激素,引起甲亢的发生^[14]。以往 GD 细胞模型研究多采用临床 GD 患者血清中提取的 TRAb 刺激甲状腺细胞,但因其提取的血清成分复杂、纯度较低、效能稳定性差等问题,限制了其应用^[15,16]。近十年来随着技术的发展,国外学者已获取了多种 TRAb 的单克隆抗体,如 M22、K1-18 等^[17],被广泛应用于 GD 和 Graves 眼病的研究,提示它们具有较稳定的效能^[18,19]。其中,来源于人体的 M22 是刺激甲状腺细胞 TSH 受体信号传导通路较为敏感的抗体,可较好的

模拟 TSAb 的作用^[20,21]。故本研究选取 M22 刺激 FRTL-5 细胞建立体外研究 GD 细胞增殖模型,通过采用 CCK8 法检测 M22 对细胞增殖的时效、量效关系,结果显示,M22 可呈浓度和时间依赖性促进 FRTL-5 细胞增殖,且 1 $\mu\text{g/mL}$ 及 24 h 甲状腺细胞增殖作用最强。

自噬是细胞内大分子蛋白降解的一种主要途径,普遍存在于所有真核生物细胞中,参与细胞生长、增殖、分化、衰老、凋亡等多种重要细胞生理病理过程的调节,这在维持细胞的稳态中发挥重要作用^[22,23]。目前研究已证实自噬相关基因缺失或自噬功能障碍广泛存在于多种疾病的病理生理过程^[24]。甲状腺作为人体内分泌器官之一,自噬在维持甲状腺细胞正常功能方面发挥着重要的作用,这不仅体现在自噬的激活是甲状腺细胞的一种自我保护机制,使其免受各种有害应激所诱导的细胞凋亡,有助于维持甲状腺细胞正常的分泌功能^[25]。目前研究已报道,细胞自噬功能异常与桥本甲状腺炎^[26]、甲状腺癌^[27]、Graves 眼病^[28]等病理过程相关,而通过药物干预后自噬可表现出抑制甲状腺细胞过度增殖或促进细胞的死亡等^[29,30],从而使机体达到“动态平衡”状态。透射电镜用于观察自噬体超微结构被推荐为观察自噬形成的“金标准”,LC3 被公认为自噬体形成的标志性蛋白,LC3 II 的形成与自噬活性强弱相关,Beclin1 是调节自噬形成的关键基因,故 LC3 II/I 和 Beclin1 的表达变化常常作为监测自噬发生或形成的标志物^[31]。本研究结果显示,正常组甲状腺细胞内可观察到双层膜包绕的自噬体结构;与正常组相比,模型组自噬小体及自噬溶酶体结构消失,同时伴有 LC3 II/I、Beclin1 蛋白表达水平下调,提示细胞自噬形成过程受阻或功能障碍参与 GD 甲状腺细胞的过度增殖机制。

自噬作用受阻机体将产生大量的病理产物—衰老或异常的细胞器、蛋白质等,与中医学中正气不足,继之内生痰浊、瘀血等有形之邪有关,故细胞自噬的发生与中医学阴虚、痰浊、瘀血密切相关^[32,33],这与 GD 的中医基本病机相符。在中医学理论指导下,进一步观察滋阴潜阳、化痰散结中药甲亢宁胶囊对 GD 甲状腺细胞增殖过程中的自噬调节作用。本课题组前期体内外实验均表明,甲亢宁胶囊可通过 mTOR 信号通路抑制 GD 模型小鼠和 FRTL-5 细胞的增殖,从而促进细胞的凋亡^[4,5]。研究显示,化痰散结中药(玄参、土贝母、夏枯草)可改善 GD 模型小鼠甲状腺自身免疫调控开关,重建细胞动态平衡的作用^[34]。故本研究则进一步从细胞自噬活性表达角度探讨了甲亢宁胶囊的作

用,发现甲亢宁胶囊可以促进模型组甲状腺细胞的自噬活性表达,表现为与模型组比较,中药组甲状腺细胞自噬关键蛋白 LC3 II/I、Beclin1 表达升高,自噬体及溶酶体超微结构出现。故该研究首次从自噬与甲状腺细胞过度增殖关系视角,探讨了中药防治 GD 的相关分子机制,丰富了中医药治疗甲亢的内涵和科学依据。然而本研究也存在一定的不足之处:首先,本实验只检测了自噬体形成蛋白 LC3 和 Beclin1 提示自噬的发生,如果能够用含或不含溶酶体降解抑制剂氯喹作用观察中药对自噬标记蛋白表达的影响,则更容易说明中药对自噬体的形成和(或)溶酶体的降解发挥一定的干预作用。其次,自噬的形成是一个动态变化的过程,如果能对药物作用时间与自噬表达变化之间的关系加以探索,则更有助于说明药物对自噬的影响。所以,在后续工作中有待于针对以上问题展开进一步研究。

利益冲突:本研究不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Burch HB, Cooper DS. Management of graves disease: a review [J]. JAMA, 2015, 314 (23): 2544 - 2554.
- [2] Marinò M, Latrofa F, Menconi F, et al. Role of genetic and non-genetic factors in the etiology of Graves' disease [J]. J Endocrinol Invest, 2015, 38(3): 283 - 294.
- [3] Giménez-Barcons M, Colobran R, Gómez-Pau A, et al. Graves' disease tshr-stimulating antibodies (tsabs) induce the activation of immature thymocytes: a clue to the riddle of tsabs generation? [J]. J Immunol, 2015, 194(9): 4199 - 4206.
- [4] 李青穆,魏军平,李敏,等.甲亢宁胶囊对 GD 小鼠甲状腺功能及 Akt/mTOR 信号通路的影响[J].中国中西医结合杂志,2015,35(9):1119 - 1124.
- [5] 孟淑华.中药甲亢宁胶囊对 FRTL-5 细胞 TSHR 信号转导通路的作用机制研究[D].北京:中国中医科学院中国中医研究院,2014.
- [6] 林兰,王秋虹,易泳鑫.siRNA 沉默细胞外信号调节酶 1/2 基因协同甲亢宁胶囊对大鼠甲状腺细胞-5 细胞增殖的影响[J].中国中医药信息杂志,2016,23(6):43 - 46.
- [7] 林兰,李鸣楠,刘喜明,等.甲亢宁对甲亢大鼠甲状腺激素及心钠素的影响[J].中国中医基础医学杂志,2005,11(1):34 - 35.
- [8] 任志雄,李光善,黄达,等.林兰谈甲状腺功能亢进症的中医诊治[J].中国中医基础医学杂志,2013,19(6):651 - 652.
- [9] 林兰,倪青,张润云,等.甲状腺机能亢进症的病因学

- 研究—附 266 例临床报告[J]. 辽宁中医杂志, 1999, 26(10): 448-449.
- [10] 林兰, 李鸣镝, 刘喜明, 等. 中药甲亢宁治疗阴虚阳亢型甲状腺功能亢进症的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 29(3): 144-147.
- [11] 孟祥. 甲亢宁胶囊对 Graves 病减毒增效作用的临床观察[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [12] Cappelli C, Gandossi E, Castellano M, et al. Prognostic value of thyrotropin receptor antibodies (TRAb) in Graves' disease: a 120 months prospective study [J]. *Endocr J*, 2007, 54(5): 713-720.
- [13] Davies TF, Yeo PP, Evered DC, et al. Value of thyroid-stimulating-antibody determinations in predicting short-term thyrotoxic relapse in Graves' disease [J]. *Lancet*, 1977, 1(8023): 1181-1182.
- [14] Bartalena L. Diagnosis and management of Graves disease: a global overview [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2013, 9(12): 724-734.
- [15] 郭辉, 徐利, 张景宇. 用 HEK-TSHR 细胞检测 TSAb 时不同浓度 PEG 提取 IgG 对结果的影响[J]. 临床检验杂志, 2004, 22(6): 449-450.
- [16] Ochi Y, Kajita Y, Inui T, et al. Sensitive thyroid-stimulating antibody assay in whole serum containing five percent polyethylene glycol using porcine thyroid cells [J]. *Thyroid*, 2000, 10(8): 653-657.
- [17] Sanders J, Miguel RN, Furmaniak J, et al. TSH receptor monoclonal antibodies with agonist, antagonist, and inverse agonist activities [J]. *Methods Enzymol*, 2010, 485(485): 393-420.
- [18] Sanders J, Núñez Miguel R, Sanders P, et al. Mechanism of TSHR activation by TSH and thyroid stimulating antibodies [J]. *Eur Thyroid J*, 2014, 3 (Suppl 1): 82.
- [19] Smith TJ, Padovani-Claudio DA, Lu Y, et al. Fibroblasts expressing the thyrotropin receptor overarch thyroid and orbit in Graves' disease [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(12): 3827-3837.
- [20] Núñez MR, Sanders J, Chirgadze DY, et al. Thyroid stimulating autoantibody M22 mimics TSH binding to the TSH receptor leucine rich domain: a comparative structural study of protein-protein interactions [J]. *J Mol Endocrinol*, 2009, 42(5): 381-395.
- [21] Núñez MR, Sanders J, Chirgadze DY, et al. Thyroid stimulating autoantibody M22 mimics TSH binding to the TSH receptor leucine rich domain: a comparative structural study of protein-protein interactions [J]. *J Mol Endocrinol*, 2009, 42(5): 381-395.
- [22] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion [J]. *Nature*, 2008, 451(7182): 1069-1075.
- [23] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease [J]. *Cell*, 2008, 132(1): 27-42.
- [24] Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(19): 1845-1846.
- [25] Lu CH, Liu YW, Hua SC, et al. Autophagy induction of reversine on human follicular thyroid cancer cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2012, 66(8): 642-647.
- [26] Xu C, Fei W, Mao C, et al. Excess iodine promotes apoptosis of thyroid follicular epithelial cells by inducing autophagy suppression and is associated with Hashimoto thyroiditis disease [J]. *J Autoimmun*, 2016, 75: 50-57.
- [27] Kim HM, Kim ES, Koo JS. Expression of autophagy-related proteins in different types of thyroid cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3): E540.
- [28] Yoon JS, Lee HJ, Chae MK, et al. Autophagy is involved in the initiation and progression of Graves' orbitopathy [J]. *Thyroid*, 2015, 25(4): 445-454.
- [29] Fan D, Liu Y, van Hasselt CA, et al. Estrogen receptor alpha induces pro-survival autophagy in papillary thyroid cancer via stimulating reactive oxygen species and extracellular-signal-regulated kinases [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(4): 561-571.
- [30] Lu CH, Liu YW, Hua SC, et al. Autophagy induction of reversine on human follicular thyroid cancer cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2012, 66(8): 642-647.
- [31] Klionsky D, Aghi M, Agam G, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (2nd edition) [J]. *Autophagy*, 2012, 4(1): 151-175.
- [32] 鲍家宽, 潘磊, 陈培丰. 细胞自噬的发生机制及中医药对其干预作用进展 [J]. 上海中医药杂志, 2016, 50(10): 99-102.
- [33] 马艺鑫, 张妮, 贾连群, 等. 基于“痰浊血瘀”病机探讨自噬与动脉粥样硬化的关系 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(9): 2240-2242.
- [34] 袁泉. 化痰散结法干预 Graves 病小鼠甲状腺肿大与功能亢进的免疫调控研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.

(收稿: 2017-12-11 在线: 2018-09-05)

责任编辑: 汤静