

赵慧, 陈文文, 朱丽萍, 等. 1,25(OH)₂D₃ 通过抑制 TLR2/NF-κB 信号通路保护实验性自身免疫性甲状腺炎大鼠甲状腺功能研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 78-86.

Zhao H, Chen WW, Zhu LP, et al. 1,25(OH)₂D₃ protects thyroid functions in experimental autoimmune thyroiditis rats by inhibiting the TLR2/NF-κB signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 78-86.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 03. 000

1,25(OH)₂D₃ 通过抑制 TLR2/NF-κB 信号通路 保护实验性自身免疫性甲状腺炎大鼠甲状腺功能研究

赵 慧¹, 陈文文^{1*}, 朱丽萍¹, 葛 鸿²

(1. 青岛市中医医院(市海慈医院)内分泌科, 山东 青岛 266033; 2. 青岛市中医医院(市海慈医院)神经外科, 山东 青岛 266033)

【摘要】 目的 基于 TLR2/NF-κB 信号通路研究 1,25(OH)₂D₃ 对实验性自身免疫性甲状腺炎大鼠的保护作用机制。**方法** 将大鼠随机分为对照组、模型组、硒酵母片对照组和 1,25(OH)₂D₃ 低、中、高剂量组。除对照组外,其余大鼠采用皮下注射甲状腺球蛋白(PTg)建立自身免疫性甲状腺炎大鼠模型,1,25(OH)₂D₃ 低、中、高剂量组分别给予腹腔注射 0.5、1.0、1.5 μg/kg 1,25(OH)₂D₃ 注射剂,对照组和模型组注射等量蒸馏水,硒酵母片对照组注射等量硒酵母混悬液(每天 1 次),连续 4 周。观察大鼠甲状腺组织变化,检测大鼠甲状腺功能因子、血清炎症因子、甲状腺自身抗体含量及 TLR2/NF-κB 信号通路相关蛋白水平及基因表达量。**结果** 与模型组大鼠比较,1,25(OH)₂D₃ 各组大鼠血清游离三碘甲状腺原氨酸(FT3)、游离甲状腺素(FT4)及促甲状腺激素(TSH)水平、甲状腺球蛋白抗体(TGAb)、甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-12(IL-12)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)及甲状腺组织 TLR2、MyD88、TRAF-6 和 NF-κB mRNA 和蛋白表达均不同程度降低,而白细胞介素-10(IL-10)不同程度增加,高剂量 1,25(OH)₂D₃ 组与模型组差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 1,25(OH)₂D₃ 对自身免疫性甲状腺炎大鼠的甲状腺功能有一定的改善作用,并能提高自身免疫抗体水平,其机制可能与 1,25(OH)₂D₃ 抑制 TLR2/NF-κB 信号通路活性,从而调控 IL-6、IL-10、IL-12 和 TNF-α 等炎症因子释放有关。

【关键词】 1,25(OH)₂D₃; 自身免疫甲状腺炎; 大鼠; TLR2; NF-κB

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0078-09

1,25(OH)₂D₃ protects thyroid functions in experimental autoimmune thyroiditis rats by inhibiting the TLR2/NF-κB signaling pathway

ZHAO Hui¹, CHEN Wenwen^{1*}, ZHU Liping¹, GE Hong²

(1. Department of Endocrinology, Qingdao Hospital of Traditional Chinese Medicine (Hiser Hospital), Qingdao 266033, China.

2. Department of Neurosurgery, Qingdao Hospital of Traditional Chinese Medicine (Hiser Hospital), Qingdao 266033)

【Abstract】 Objective To study the protective mechanism of 1,25(OH)₂D₃ in experimental autoimmune thyroiditis rats based on the TLR2/NF-κB signaling pathway. **Methods** Rats were randomly divided into control, model, and selenium yeast tablet control groups, and 1,25(OH)₂D₃ low, medium and high dose groups. Except for the control group, the rats were injected subcutaneously with thyroglobulin (PTg) to establish an autoimmune thyroiditis model. The low, medium and high dose groups of 1,25(OH)₂D₃ were injected intraperitoneally with 0.5, 1.0 and 1.5 μg/kg 1,25(OH)₂D₃, the control and model groups were injected with the same amount of distilled water and selenium yeast tablets, and the control group was injected with the same amount of selenium yeast suspension (once a day) for 4 weeks. Thyroid

[作者简介] 赵慧(1981—),女,本科,主治医师,研究方向:内分泌。E-mail: zhaohuiqd2018@163.com

[通信作者] 陈文文(1984—),女,硕士,主治医师,研究方向:内分泌。E-mail: chenwen129@126.com

function factors, serum inflammatory factors, thyroid autoantibodies, TLR2/NF- κ B signaling pathway-related protein levels, and gene expression were analyzed. **Results** Compared with autoimmune thyroiditis rats, serum free thyroid glycine, free thyroxine, thyroid-stimulating hormone, thyroglobulin antibody, and thyroid peroxidase antibody, and interleukin (IL)-6, IL-12, tumor necrosis factor α (TNF- α), thyroid tissue TLR2, MyD88, TRAF-6 and NF- κ B mRNA and protein expression were reduced, and IL-10 was increased in 1,25(OH) $_2$ D $_3$ group rats. The difference between high dose 1,25(OH) $_2$ D $_3$ and model groups was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** 1,25(OH) $_2$ D $_3$ improves the thyroid functions of rats with autoimmune thyroiditis and increases the level of autoimmune antibodies. The mechanism may be related to inhibition of the TLR2/NF- κ B signaling pathway by 1,25(OH) $_2$ D $_3$, which regulates the release of inflammatory factors such as IL-6, IL-10, IL-12 and TNF- α .

【Keywords】 1,25(OH) $_2$ D $_3$; autoimmune thyroiditis; rats; TLR2; NF- κ B

自身免疫性甲状腺疾病(autoimmune thyroid disease, AITD)是病变部位主要发生在甲状腺的自身免疫性疾病,主要包括 Grave 病(GD)和桥本甲状腺炎(hashimotos thyroiditis, HT),其发病机制复杂,涉及遗传、免疫和环境等多种因素^[1-2]。目前的研究发现,AITD 与甲状腺细胞炎症相关信号转导异常、炎症反应有关^[3],而维生素 D 在机体多种自身免疫性疾病中起调节免疫系统、增强固有免疫系统和抑制抑制适应性免疫系统的作用^[4]。1,25 二羟基维生素 D $_3$ (1,25-dihydroxy vitamin D $_3$, 1,25(OH) $_2$ D $_3$)是维生素 D 在体内的主要活性代谢产物,通过与细胞内的特异性维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)结合在机体骨钙代谢、细胞生长和分化中发挥重要作用^[5-6]。大量的研究表明,维生素 D 与 AITD 相关,缺乏维生素 D 可能增加罹患 AITD 的风险,但关于其对 AITD 的作用机制及其对机体自身免疫情况的研究还较为缺乏^[7-10]。因此,本研究建立实验性自身免疫性甲状腺炎大鼠模型,研究 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 对自身免疫性甲状腺炎大鼠免疫指标及以 TLR2/NF- κ B 信号通路的影响,以期对自身免疫性甲状腺炎的临床治疗提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性健康大鼠 120 只,4~5 周龄,体重(200 $\pm$ 10)g,由青岛博隆实验动物有限公司提供[SCXK(鲁)2017-0006]。所有动物饲养于青岛市中医医院动物中心[SYXK(鲁)2018-0026]暂养,温度保持在 21 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C,相对湿度为 50%~60%,自然光照明,自由进食进水,保持饲养环境清洁,适应性饲喂 1 周后进行实验分组和造模。所有实验动物经青岛市中医医院实验伦理委员会审核并批准(IACUC-2018-0141),实验过程遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

1,25(OH) $_2$ D $_3$ 注射剂(江苏吴中医药集团有限公司,15 mg/mL,批号 130232);完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)、不完全弗氏佐剂(incomplete Freund's adjuvant, IFA)(美国 Sigma 公司);大鼠甲状腺球蛋白(mouse thyroglobulin, mTg)(上海源叶生物科技有限公司);血清游离三碘甲状腺原氨酸(free triiodothyronine, FT3)、血清游离甲状腺素(free thyroxine, FT4)及促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH)放射免疫分析试剂盒(北京北方生物技术研究所);白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-10、IL-12 及肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor, TNF- α)酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒(上海广锐生物科技有限公司);甲状腺球蛋白抗体(thyroglobulin antibody, TGAb)、甲状腺过氧化物酶抗体(thyroid peroxidase antibody, TPOAb)(武汉基因美生物科技有限公司);兔抗大鼠 TLR2、NF- κ B、MyD88、TRAF-6 抗体, β -actin 蛋白抗体(英国 Abcam 公司);DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);HRP 标记羊抗兔 IgG(上海拜沃生物科技有限公司);TRIzol 总 RNA 提取试剂(Invitrogen 公司);RNA 反转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司);SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒(美国 Bio-Rad 公司);RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司);超敏化学发光试剂盒(瑞士 Thermo 公司);HE 染色试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

CX41 型光学显微镜购自日本 Olympus 公司;ChemiDoc XRS 型凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司;Centrifuge 5430R 低温高速离心机购自德国 Eppendorf 公司;HM 340E 切片机购自赛默飞世尔(中国)有限公司;UV2100 型紫外分光光度计(日本岛津有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物造模

按照参考文献^[11]对除对照组外的实验大鼠进行造模,对造模大鼠给予 100 μg 的 mTg+CFA 皮下注射,连续 2 周,每周 1 次,完成大鼠初次免疫;从第 3~6 周,再对造模大鼠给予相同剂量的 mTg+CFA 皮下注射进行重复免疫,对照组大鼠给予水+CFA 皮下注射,注射时间及次数与模型组一致。第 7 周取造模大鼠眶静脉血,采用 ELISA 法测定血清 TPOAb 水平,TPOAb>60 IU/mL 即为造模成功。造模过程中死亡 3 只大鼠,造模成功率为 97%。

1.3.2 分组及给药

将造模成功大鼠按随机数字表法分为模型组和 1,25(OH)₂D₃ 低、中、高剂量组,每组 15 只。从第 7 周开始对治疗组大鼠进行药物干预,低、中、高剂量组每天给予大鼠腹腔注射 0.5、1.0、1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 1,25(OH)₂D₃ 注射剂,对照组和模型组注射等量蒸馏水,硒酵母片对照组注射硒酵母混悬液(每天 1 次),连续干预 4 周。

1.3.3 HE 染色

末次给药后麻醉处死大鼠,摘取大鼠甲状腺组织,采用 4% 多聚甲醛溶液固定大鼠甲状腺组织 1 周,经乙醇脱水、石蜡包埋、苏木精-伊红(HE)染色后切片(5 μm),光学显微镜下观察各组大鼠甲状腺组织病理结构改变,应用 Image J 图像分析软件统计细胞核数和甲状腺滤泡面积。

1.3.4 大鼠血清甲状腺激素、自身免疫抗体及炎症因子检测

末次给药后麻醉大鼠,采集心脏血 2 mL,离心 20 min(3000 r/min),收集上清液,采用 ELISA 试剂

盒按操作规程检测各组大鼠血清自身免疫抗体(TGAb、TPOAb)水平及炎症因子(IL-6、IL-10、IL-12、TNF- α)水平;采用 RIA 法检测大鼠血清 FT3、FT4 及 TSH 水平。

1.3.5 RT-PCR

大鼠基因序列从美国国家生物技术中心相关数据库查询获得,通过 Primer Premier 6.0 软件设计,引物序列(见表 1),由上海生物工程股份有限公司合成。取大鼠甲状腺组织并采用超声粉碎,TRIzol 提取总 RNA,紫外分光光度计测定吸光度值,分析总 RNA 纯度。用反转录试剂盒合成 cDNA,PCR 扩增,荧光定量 PCR 仪检测 mRNA 表达水平。反应体系为 30 μL (SYBR Green PCR Master Mix(2 $\times$) 15 μL , cDNA 1 μL , Primer A、Primer B 各 0.5 μL ,无 RNA 酶 H₂O 13 μL)。定量扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s,共 40 个循环。反应均以 β -actin 为内参,采用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 算法计算 mRNA 相对表达量。

1.3.6 Western blot

取小鼠甲状腺组织,置于匀浆器中,加入 RIPA 细胞裂解液裂解后匀浆,低温高速离心机离心(12000 r/min,10 min),收集上清液并采用 BCA 法测定蛋白浓度。取 30 μL 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电转至 PVDF 膜,浸入含有 5% 脱脂奶粉的封闭液中孵育 1 h,加入适宜浓度一抗室温下封闭过夜。次日加入辣根过氧化物酶标记二抗孵育 1 h,TBST 冲洗后采用 ECL 化学发光试剂盒进行检测,凝胶成像系统成像,以 GAPDH 为内参,分析条带灰度值,计算小鼠 TLR4、NF- κB p65 和 I- $\kappa\text{B}\alpha$ 蛋白相对表达量。

表 1 TLR2/NF- κB 信号通路相关基因及内参引物序列
Table 1 TLR2/NF- κB signaling pathway related genes and primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	扩增产物大小 Amplification product size
TLR2-F	5'-GCTCACCAGATGAAGAAG-3'	106 bp
TLR2-R	5'-TCCAAGATGTAACGCAA-3'	
NF- κB -F	5'-AAAATGCCCCACGGTTATG-3'	134 bp
NF- κB -R	5'-ATTCGCTTTGCCTTCCTCC-3'	
MyD88-F	5'-GCCAGGTTTGCATCTTCTATT-3'	110 bp
MyD88-R	5'-GGAGACTCACTTTCTTGGGGAC-3'	
TRAF-6-F	5'-TCTGCTTGATGGCTTTACGG-3'	183 bp
TRAF-6-R	5'-TTACCGTCAGGGAAGAATCTC-3'	
β -actin-F	5'-GCCATGTACGTAGCCATCCA-3'	175 bp
β -actin-R	5'-GAACCGCTCATTGCCGATAG-3'	

1.4 统计学方法

数据统计采用 SPSS 21.0 软件,数据采用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD-*t* 检验,采用 Graphpad 5.0 进行绘图分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

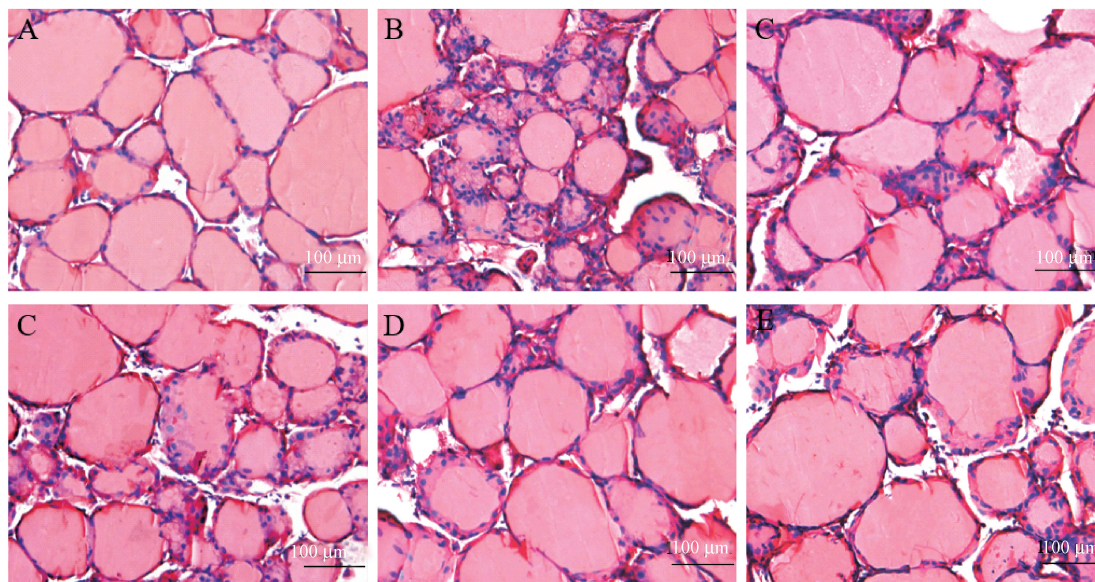
2.1 各组大鼠甲状腺组织病理改变情况

对照组大鼠甲状腺滤泡大小适中,腔内胶质充盈,滤泡上皮细胞完整,呈低立方状;模型组滤泡变小或被破坏,滤泡上皮细胞呈高柱状,细胞核数量明显增多,胶质减少,形状不规则,细胞腔内及细胞间质可见大量炎性细胞浸润;各给药组大鼠甲状腺

炎性细胞浸润减少,滤泡上皮细胞由高柱状变为立方柱状,细胞核数量减少,滤泡细胞腔内胶质增多,硒酵母片对照组小灶状改变,1,25(OH)₂D₃ 低剂量组呈小片状改变,1,25(OH)₂D₃ 中剂量组仅见散在淋巴细胞浸润,1,25(OH)₂D₃ 高剂量组呈点片状改变,见图 1、表 2。

2.2 各组大鼠甲状腺抗体和甲状腺功能比较

与对照组比较,模型组、硒酵母片对照组以及 1,25(OH)₂D₃ 各剂量组 TGAAb、TPOAb、FT3、FT4 均增加,TSH 均降低,其中模型组与对照组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,硒酵母片对照组和 1,25(OH)₂D₃ 各剂量组 TGAAb、TPOAb、FT3、FT4 均降低,TSH 均增加,呈现出剂量依赖性,差异均具有统计学意义($P<0.05$),见图 2。



注:A:对照组,大鼠甲状腺滤泡完整,大小适中,腔内胶质充盈,间质未见炎性细胞浸润;B:自身免疫性甲状腺炎模型组,大鼠甲状腺滤泡缩小或被破坏,大小不均,间质有大量炎性细胞浸润,腔内胶质减少;C:硒酵母片对照组,大鼠甲状腺滤泡结构较完整,间质炎性细胞浸润减少,胶质含量略减少;D:1,25(OH)₂D₃ 低剂量组,呈点片状改变,甲状腺滤泡大小不均,间质可见炎性细胞浸润,腔内胶质较少;E:1,25(OH)₂D₃ 中剂量组,大鼠甲状腺滤泡增大,间质少量炎性细胞浸润,腔内胶质增加;F:1,25(OH)₂D₃ 高剂量组,呈小片状改变,大鼠甲状腺滤泡结构较为完整,间质仅见散在炎性细胞浸润,胶质含量增加。

图 1 1,25(OH)₂D₃ 对各组大鼠甲状腺形态学的影响($n=5$)

Note. A, Control group, the thyroid follicles of rats were complete, moderate in size, filled with colloid in the cavity, and no inflammatory cell infiltration was found in the stroma. B, Autoimmune thyroiditis model group, the thyroid follicles were reduced or destroyed with uneven size, a large number of inflammatory cells infiltrated in the stroma, and the colloid in the cavity was reduced. C, Selenium yeast tablet control group, the structure of thyroid follicles in rats was relatively complete, the infiltration of interstitial inflammatory cells was reduced, and the content of colloid was slightly reduced. D, 1,25(OH)₂D₃ low dose group, there were patchy changes, uneven size of thyroid follicles, infiltration of inflammatory cells in the stroma and less colloid in the cavity. E, 1,25(OH)₂D₃ medium dose group, the thyroid follicles were enlarged, a few inflammatory cells infiltrated in the stroma, and the colloid in the cavity was increased. F, 1,25(OH)₂D₃ high dose group, the follicular structure of rat thyroid was relatively complete, only scattered inflammatory cell infiltration was found in the stroma, and the content of colloid increased.

Figure 1 Effect of 1,25(OH)₂D₃ on thyroid morphology of rats in each group

2.3 各组大鼠血清炎症因子水平

与对照组比较,模型组大鼠血清 IL-6、IL-12 和 TNF- α 水平显著升高 ($P<0.01$), IL-10 水平显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较,硒酵母片对照血清 IL-6、IL-12 和 TNF- α 水平显著降低 ($P<$

0.01), IL-10 水平显著增加 ($P<0.01$), 1, 25 (OH) $_2$ D $_3$ 各剂量组 IL-6 与模型组差异具有统计学意义 ($P<0.05$), 中、高剂量 1, 25 (OH) $_2$ D $_3$ 组 IL-12、IL-10 及 TNF- α 与模型组差异具有统计学意义 ($P<0.05$), 见图 3。

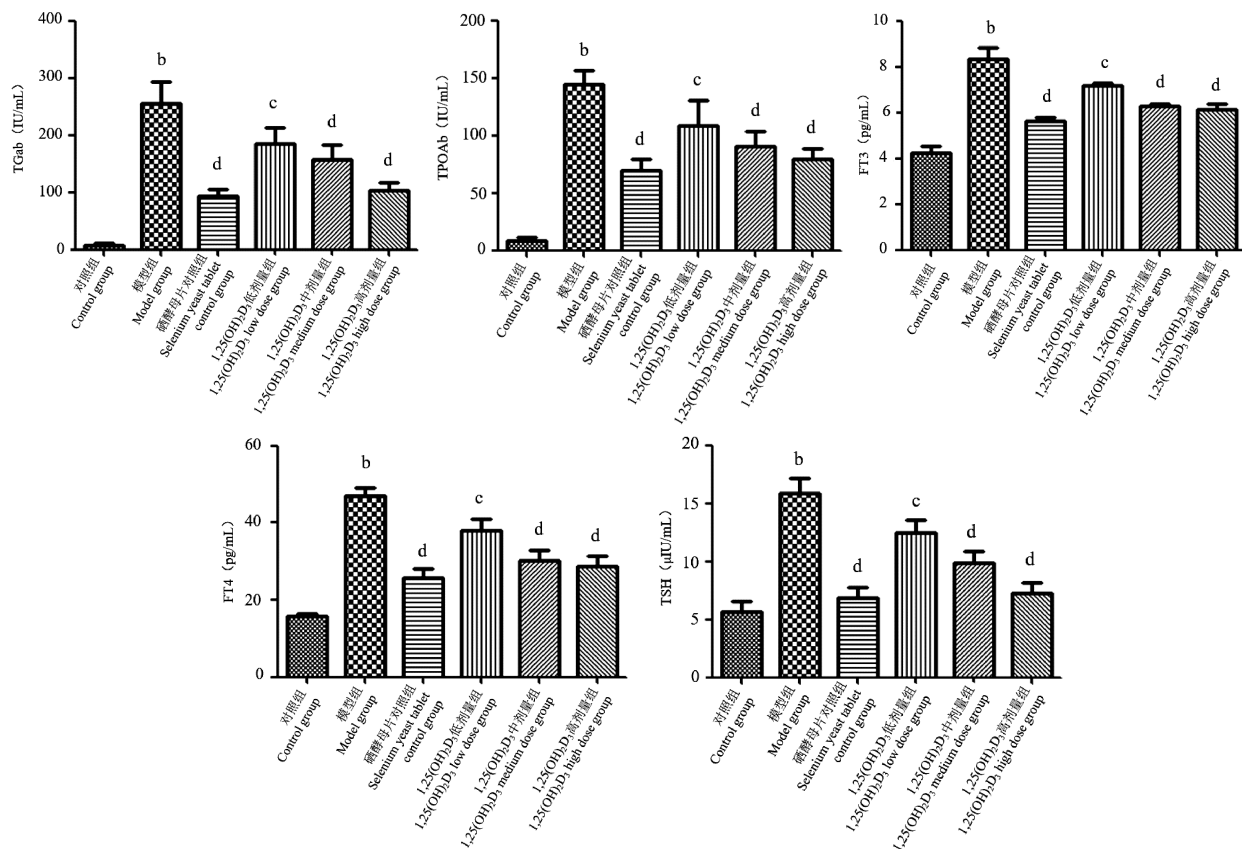
表 2 各组大鼠甲状腺系数、甲状腺细胞和核数及滤泡面积比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Table 2 Comparison of thyroid coefficient, number of thyroid cells and nuclei and follicular area in each group

组别 Groups	甲状腺系数 Thyroid coefficient	细胞核数 Nucleic number	滤泡面积(μm^2) Follicular area
对照组 Control group	0.009 $\pm$ 0.001	976.50 $\pm$ 108.57	26306.12 $\pm$ 3283.79
模型组 Model group	0.057 $\pm$ 0.016 [*]	1692.12 $\pm$ 33.45 [*]	5298.54 $\pm$ 2038.37 [*]
硒酵母片对照组 Selenium yeast tablet control group	0.030 $\pm$ 0.008 ^{*#}	1238.98 $\pm$ 189.43 [#]	15450.74 $\pm$ 3634.54 ^{**}
1,25(OH) $_2$ D $_3$ 低剂量组 1,25(OH) $_2$ D $_3$ low dose group	0.050 $\pm$ 0.013 [*]	1554.20 $\pm$ 135.80 [*]	7066.32 $\pm$ 2752.71 [*]
1,25(OH) $_2$ D $_3$ 中剂量组 1,25(OH) $_2$ D $_3$ medium dose group	0.027 $\pm$ 0.008 ^{*#}	1499.33 $\pm$ 226.69 [*]	10950.81 $\pm$ 2839.60 ^{*#}
1,25(OH) $_2$ D $_3$ 高剂量组 1,25(OH) $_2$ D $_3$ high dose group	0.027 $\pm$ 0.006 ^{*#}	1354.21 $\pm$ 290.82	14219.15 $\pm$ 5439.87 ^{*#}

注:与对照组相比, ^{*} $P<0.05$;与模型组相比, [#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the model group, [#] $P<0.05$.



注:与对照组相比, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.05$;与模型组相比, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.05$ 。

图 2 各组大鼠甲状腺抗体和甲状腺功能比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Note. Compared with the control group, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.05$. Compared with the model group, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.05$.

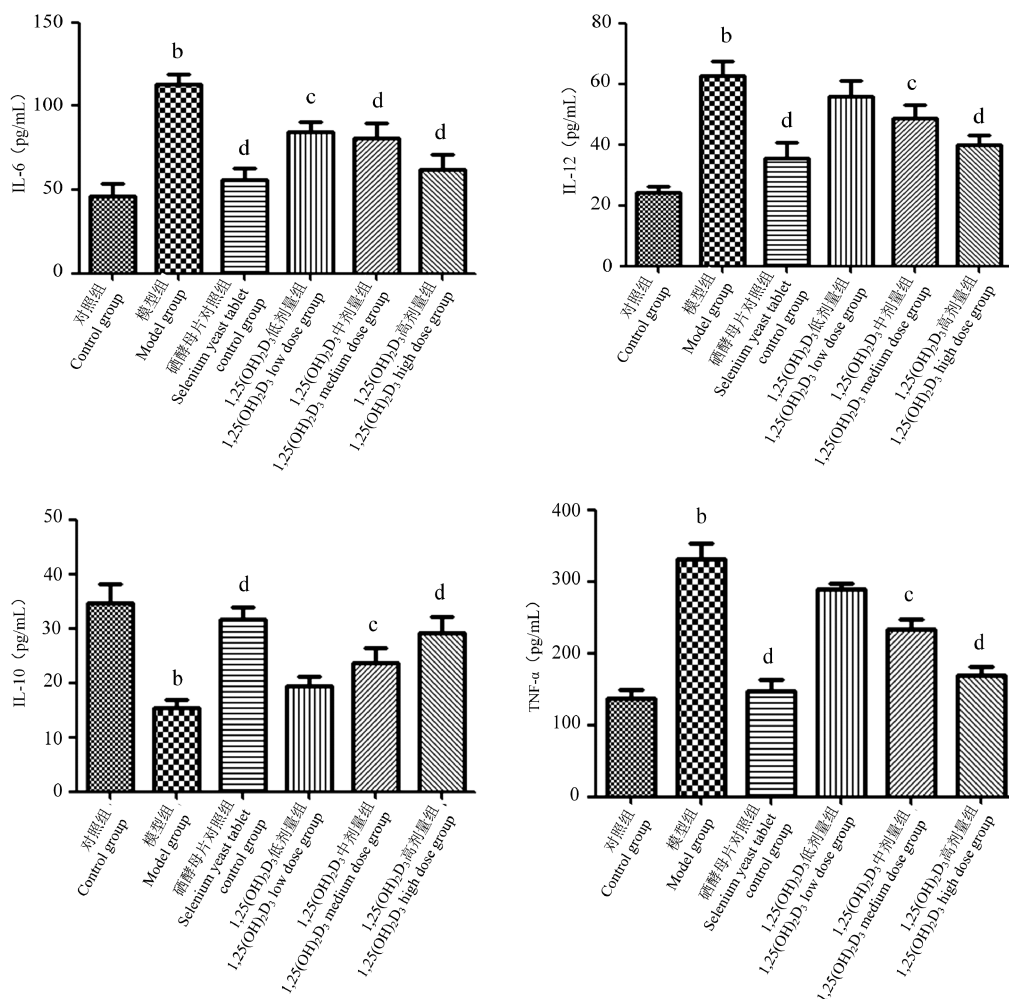
Figure 2 Comparison of thyroid antibody and thyroid function of rats in each group

2.4 各组大鼠甲状腺组织 TLR2、MyD88、TRAF-6 和 NF- κ B mRNA 表达

与对照组比较,模型组大鼠甲状腺组织中 TLR2、MyD88、TRAF-6 和 NF- κ B mRNA 表达显著均显著增加($P<0.05$)。与模型组比较,硒酵母片对照组及 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 各剂量组各指标蛋白表达均不同程度降低,硒酵母片对照组各指标蛋白 mRNA 表达水平与模型组比较差异具有统计学意义($P<0.05$);1,25(OH) $_2$ D $_3$ 各剂量组 TRAF-6 与模型组差异具有统计学意义($P<0.05$),高剂量组 TLR2、中、高剂量组 MyD88、NF- κ B 与模型组差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 4。

2.5 各组大鼠甲状腺组织 TLR2、MyD88、TRAF-6 和 NF- κ B 蛋白表达

与对照组比较,模型组大鼠甲状腺组织中 TLR2、MyD88、TRAF-6 和 NF- κ B 蛋白表达显著均显著增加($P<0.05$)。与模型组比较,硒酵母片对照组及 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 各剂量组各指标蛋白表达均不同程度降低,硒酵母片对照组各指标蛋白表达与模型组比较差异具有统计学意义($P<0.05$);1,25(OH) $_2$ D $_3$ 各剂量组 TRAF-6 蛋白表达与模型组差异具有统计学意义($P<0.05$),高剂量组 TLR2、中、高剂量组 MyD88、NF- κ B 蛋白表达与模型组差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 5。

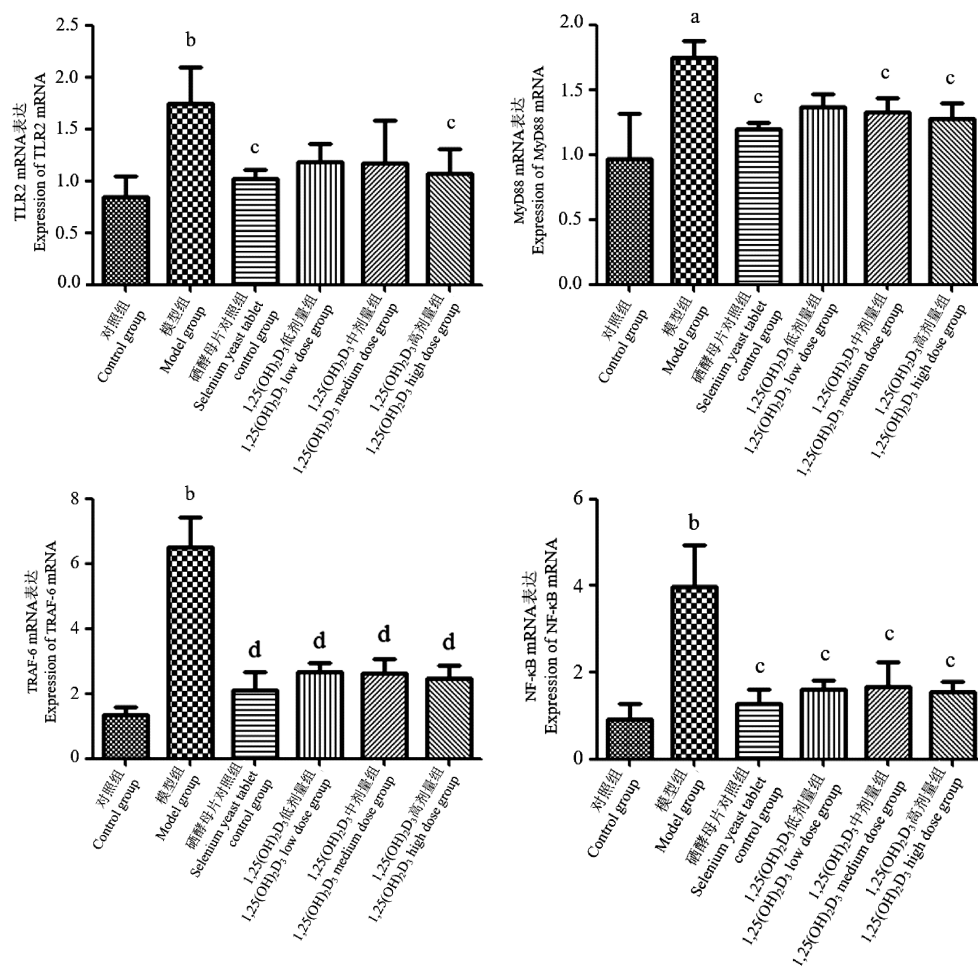


注:与对照组相比,^a $P<0.05$,^b $P<0.05$;与模型组相比,^c $P<0.05$,^d $P<0.05$ 。

图3 各组大鼠血清 IL-6、IL-12、IL-10 和 TNF- α 比较($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Note. Compared with the control group, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.05$. Compared with the model group, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.05$.

Figure 3 Comparison of serum IL-6, IL-12, IL-10 and TNF- α in each group

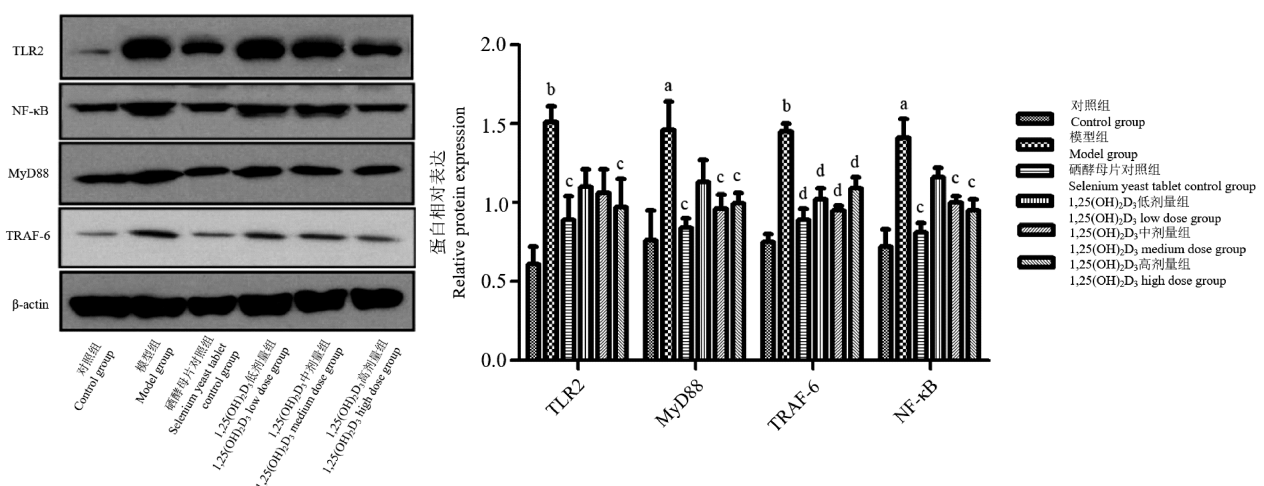


注:与对照组相比,^a $P<0.05$,^b $P<0.05$;与模型组相比,^c $P<0.05$,^d $P<0.05$ 。

图4 各组大鼠甲状腺组织 TLR2、MyD88、TRAF-6 和 NF-κB mRNA 表达($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Note. Compared with the control group, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.05$. Compared with the model group, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.05$.

Figure 4 mRNA expression of TLR2, MyD88, TRAF-6 and NF-κB in thyroid tissue of rats in each group



注:与对照组相比,^a $P<0.05$,^b $P<0.05$;与模型组相比,^c $P<0.05$,^d $P<0.05$ 。

图5 各组大鼠甲状腺组织 TLR2、MyD88、TRAF-6 和 NF-κB 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Note. Compared with the control group, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.05$. Compared with the model group, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.05$.

Figure 5 Comparison of TLR2, MyD88, TRAF-6 and NF-κB protein expression in thyroid tissue of rats in each group

3 讨论

甲状腺能够调节机体能量代谢速度、机体合成蛋白以及调节机体对多种激素的敏感性。为研究 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对自身免疫性甲状腺炎大鼠的影响,本研究采用多次注射 mTg+CFA 进行大鼠免疫建立自身免疫性甲状腺炎模型。HE 染色结果显示,模型大鼠甲状腺组织被大量炎性细胞浸润,滤泡腔内胶质减少,形状不规则,提示造模成功。模型大鼠血清水平 FT3、FT4、TSH 及 TGAb、TPOAb 水平显著增加,提示模型大鼠甲状腺功能减退,而 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 干预后,大鼠甲状腺组织炎性细胞浸润减少,滤泡形状趋于规则,腔内胶质增加,血清水平 FT3、FT4、TSH 及 TGAb、TPOAb 水平不同程度降低,提示 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可有效改善自身免疫性甲状腺炎大鼠甲状腺功能。

自身免疫性甲状腺炎属于免疫性疾病,其发病多与免疫细胞、免疫因子及其免疫相关信号通路相关^[12]。维生素 D 是一种脂溶性维生素,在包括 T 细胞、B 细胞和抗原呈递细胞上均有表达, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 是其活性形式,可直接导致免疫状态改变^[13-14]。维生素 D 对自身免疫性疾病的影响主要体现在 CD4^+ T 细胞的功能由 1 类辅助性 T 细胞(helper T cell 1, Th1)和 2 类辅助性 T 细胞(helper T cell 2, Th2)两条链相互拮抗保持平衡^[15]。Th1 型细胞可分泌促炎性细胞因子 IL-6、IL-10 和 TNF- α ,从而促进免疫应答^[16],Th2 型细胞可分泌抗炎性细胞因子 IL-10,从而抑制免疫应答^[17]。IL-6 为趋化因子家族成员,具有促进 T 淋巴细胞增殖和活化,促进 B 细胞增殖和分泌抗体等功能^[18]。IL-12 主要由 B 细胞和巨噬细胞产生,具有促进活性 T 细胞增殖、促进 Th0 细胞向 Th1 细胞分化、诱导细胞毒性 T 淋巴细胞与 NK 细胞的毒性并促进其分泌 TNF- α 、INF- γ 的作用^[19]。IL-10 可抑制活化 T 淋巴细胞,减少甲状腺内 CD4^+ 和 CD8^+ 淋巴细胞数量,抑制甲状腺组织中淋巴细胞浸润^[20]。TNF- α 为促炎因子,参与机体免疫反应和炎症反应。本研究显示,模型组大鼠血清 IL-6、IL-12 和 TNF- α 水平较正常对照组显著升高,IL-10 含量则显著降低,而 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 干预后可显著降低大鼠血清 IL-6、IL-12 和 TNF- α 水平,增加血清 IL-10 水平(图 3)。在维生素 D 充足的情况下, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 能抑制 Th1 细胞分泌因子,从而降低血清 IL-6、IL-10 和 TNF- α

水平。王栋钢等^[21]早期的研究表明, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可下调 INF- γ 水平、上调 IL-10 水平,有利于恢复和维持 Th1 和 Th2 平衡。

TLR 是一种跨膜受体蛋白,当机体受到外源分子刺激时,TLR 与 MyD88 结合,IL-1 受体相关激酶 4 (IRAK-4)磷酸化后与激活肿瘤坏死因子受体相关基因 6 (TRAF-6)相互作用,促 I- κ B 磷酸化降解,激活 NF- κ B,诱导炎症因子表达,最终导致炎症发生^[22-23]。NF- κ B 是一种关键的核转录因子,可促进炎性细胞因子的表达,在免疫和炎症反应中具有重要作用^[24]。本研究结果显示,与自身免疫性甲状腺炎模型大鼠比较, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 各剂量组 TLR2、MyD88、TRAF-6 和 NF- κ B mRNA 和蛋白表达均降低。结合炎症因子 IL-6、IL-10、IL-12 和 TNF- α 的变化,表明 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 能通过 TLR2/NF- κ B 信号通路抑制炎症因子 IL-6、IL-10、IL-12 和 TNF- α 的表达,从而减轻自身免疫性甲状腺炎大鼠炎症反应。

综上所述, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对自身免疫性甲状腺炎大鼠的甲状腺功能有一定的改善作用,并能机体自身免疫抗体水平,其机制可能与 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 抑制 TLR2/NF- κ B 信号通路活性,从而调控 IL-6、IL-10、IL-12 和 TNF- α 等炎症因子释放有关。

参考文献:

- [1] Wiersinga WM. Clinical relevance of environmental factors in the pathogenesis of autoimmune thyroid disease [J]. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 2016, 31(2): 213-222.
- [2] Ramos-Leví AM, Marazuela M. Pathogenesis of thyroid autoimmune disease: the role of cellular mechanisms [J]. *Endocrinol Nutr*, 2016, 63(8): 421-429.
- [3] 岳枫, 李长峰, 朱长波. EB 病毒 VCA-IgG、IgA 抗体在自身免疫性疾病检测中的应用比较 [J]. *实用医学杂志*, 2015, 31(8): 1256-1258.
- [4] 李莉华. 维生素 D、调节性 T 细胞与自身免疫性甲状腺疾病的研究进展 [J]. *临床内科杂志*, 2019, 36(5): 359-360.
- [5] Gorman S, Zafraou MZ, Lim EM, et al. High-dose intramuscular vitamin D provides long-lasting moderate increases in serum 25-hydroxyvitamin D levels and shorter-term changes in plasma calcium [J]. *J Am Med Assoc*, 2017, 317(10): 1337-1344.
- [6] 李秀华, 李晓丽, 段瑞生, 等. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 诱导实验性自身免疫性重症肌无力大鼠免疫耐受的机制 [J]. *山东大学学报(医学版)*, 2015, 53(8): 5-10.
- [7] 龙雄, 陈晓铭, 马育林, 等. 血清 25 羟-维生素 D、碘营养状况与自身免疫性甲状腺病的相关性 [J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(17): 4362-4363.
- [8] Ke W, Sun T, Zhang Y, et al. 25-Hydroxyvitamin D serum level in Hashimoto's thyroiditis, but not Graves' disease is relatively

- deficient [J]. *Endocr J*, 2017, 64(6): 581-587.
- [9] Grove-Laugesen D, Cramon PK, Malmstroem S, et al. Effects of supplemental vitamin D on muscle performance and quality of life in Graves' disease: a randomized clinical trial [J]. *Thyroid*, 2020, 30(5): 661-671.
- [10] Li X, Wang G, Lu Z, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D predict prognosis in radioiodine therapy of Graves' disease [J]. *J Endocrinol Invest*, 2015, 38(7): 753-759.
- [11] 余欣然, 向楠, 曾明星, 等. 夏枯草胶囊对自身免疫性甲状腺炎大鼠甲状腺组织及 Fas、FasL 表达的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18(7): 1239-1242.
- [12] 祁岗, 朱艳媚, 李焱, 等. NF- κ B 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(20): 46-50.
- [13] 江雪, 史育红, 田蓉. 维生素 D 与自身免疫性甲状腺疾病 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2018, 25(3): 436-440.
- [14] 李莉华. 维生素 D、调节性 T 细胞与自身免疫性甲状腺疾病的研究进展 [J]. *临床内科杂志*, 2019, 36(5): 359-360.
- [15] 王卫芳, 李晓慧, 徐岐山. 血清 25 羟维生素 D3 与甲状腺自身抗体及甲状腺功能的关系 [J]. *福建医科大学学报*, 2018, 52(6): 379-384.
- [16] Parry HM, Dowell AC, Zuo J, et al. PD-1 is imprinted on cytomegalovirus-specific CD4⁺ T cells and attenuates Th1 cytokine production whilst maintaining cytotoxicity [J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17(3): e1009349.
- [17] Coomes SM, Kannan Y, Pelly VS, et al. CD⁴⁺ Th2 cells are directly regulated by IL-10 during allergic airway inflammation [J]. *Mucosal Immunol*, 2017, 10(1): 150-161.
- [18] 杨雪威, 王思源, 赵佳, 等. 骨化三醇对桥本甲状腺炎大鼠血清炎性细胞因子表达的影响及其意义 [J]. *东南大学学报 (医学版)*, 2018, 37(5): 904-908.
- [19] Wallington JC, Williams AP, Staples KJ, et al. IL-12 and IL-7 synergize to control mucosal-associated invariant T-cell cytotoxic responses to bacterial infection [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(6): 2182-2195.
- [20] 李婵, 孙勤国. 益气养阴疏肝合剂通过 Fas/FasL 途径治疗大鼠桥本氏甲状腺炎 [J]. *广州中医药大学学报*, 2020, 37(1): 134-139.
- [21] 王栋钢, 熊丰, 雷培芸. 维生素 D3 对儿童桥本甲状腺炎 TH1/TH2 型细胞因子的影响 [J]. *中国实用儿科杂志*, 2006, 21(12): 936-938.
- [22] 杨春治. 雷公藤内酯醇对大鼠变应性鼻炎 TLR2-NF- κ B 信号通路的干预作用 [J]. *山西医科大学学报*, 2015, 46(7): 636-640.
- [23] 冯伟科, 于华芸, 王媛, 等. 小檗碱和大黄酸对 LPS 诱导巨噬细胞炎症反应及 TLR2/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. *山东医药*, 2018, 58(42): 24-27.
- [24] 崔毅佳, 王淑梅, 金志国. 甲氨蝶呤通过抑制 TLR2-NF- κ B 信号通路减轻类风湿关节炎大鼠滑膜炎的作用研究 [J]. *新疆医科大学学报*, 2019, 42(2): 211-216.

[收稿日期]2021-02-02