

DOI: 10.16306/j.1008-861x.2024.02.007

# 健脾消癆方对桥本甲状腺炎模型小鼠 Th1、Th17 的影响

刘梦冉, 田胜达, 张宏利, 李晓华

上海中医药大学附属第七人民医院内分泌科(上海 200137)

**【摘要】** 目的:探讨健脾消癆方是否通过调控辅助性 T 细胞(Th)比例改善桥本甲状腺炎(HT)。方法:将 40 只雌性 CBA/J 小鼠随机分为 5 组:正常对照组、模型对照组及健脾消癆方低、中、高剂量组,每组 8 只。除正常对照组外,其他小鼠采用皮下注射猪甲状腺球蛋白联合高碘水喂养诱导 HT 模型。造模结束后,正常对照组与模型对照组小鼠每天给予 0.5 mL 饮用水灌胃,健脾消癆方低、中、高剂量组小鼠每天给予健脾消癆方颗粒剂水溶液(剂量分别为 8.632 g/kg、17.264 g/kg、34.528 g/kg)灌胃,连续 6 周。干预结束后,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测小鼠血清甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)、甲状腺球蛋白抗体(TGAb)、游离三碘甲状腺原氨酸(FT3)、游离甲状腺素(FT4)、促甲状腺素(TSH)水平;采用流式细胞术检测小鼠外周血 Th1、Th2、Th17、调节性 T 细胞(Treg)比例;采用实时荧光定量 PCR 检测肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、 $\gamma$  干扰素(IFN- $\gamma$ )、白介素-17(IL-17)、*T-bet*、*ROR $\gamma$ -t* 基因表达;采用 Western blot 法检测脾脏组织 *T-bet*、*ROR $\gamma$ -t* 蛋白表达;苏木素-伊红(HE)染色观察甲状腺组织病理形态学变化。**结果:**①与模型对照组相比,健脾消癆方高剂量组小鼠血清 TPOAb 水平显著降低( $P<0.05$ ),健脾消癆方低、高剂量组小鼠的 TGAb 水平亦显著降低( $P<0.05$ )。②与模型对照组相比,健脾消癆方高剂量组小鼠血清 FT3、FT4 水平明显上升( $P<0.05$ )。③健脾消癆方可改善 HT 模型小鼠的甲状腺滤泡结构和滤泡胶质,使滤泡形态趋于规则,减轻甲状腺滤泡间淋巴细胞及浆细胞的浸润程度。④与模型对照组相比,健脾消癆方低、中、高剂量组小鼠的外周血 Th1 比例均显著下降( $P<0.05$ ),健脾消癆方低、高剂量组小鼠的 Th17 比例亦显著降低( $P<0.05$ )。⑤与模型对照组相比,健脾消癆方低、中、高剂量组小鼠的脾脏组织 *T-bet*、*ROR $\gamma$ -t* 基因相对表达量明显下降( $P<0.05$ ),健脾消癆方高剂量组的 *T-bet*、*ROR $\gamma$ -t* 蛋白表达显著下降( $P<0.05$ ),健脾消癆方中剂量组的 *T-bet* 蛋白表达显著下降( $P<0.05$ )。⑥与模型对照组相比,健脾消癆方各剂量组小鼠的 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17 基因相对表达量均明显降低( $P<0.05$ )。**结论:**健脾消癆方能通过下调 Th1、Th17 的转录分化及其相关炎症因子的分泌,抑制炎症反应,从而改善 HT。

**【关键词】** 桥本甲状腺炎;健脾消癆方;辅助性 T 细胞 1;辅助性 T 细胞 17

## Effects of Jianpi Xiaoying Formula on Th1 and Th17 in mice of Hashimoto's thyroiditis model

LIU Mengran, TIAN Shengda, ZHANG Hongli, LI Xiaohua

Department of Endocrinology, Seventh People's Hospital of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200137, China

**ABSTRACT Objective:** To investigate whether Jianpi Xiaoying Formula improving Hashimoto's thyroiditis (HT) by regulating the proportion of helper T cells (Th). **Methods:** Forty female CBA/J mice were randomly divided into five groups: the normal control group, model control group, and the low, medium and high dose groups of Jianpi Xiaoying Formula, eight mice in each group. Except for the normal control group, the HT model was induced by subcutaneous injection of porcine thyroglobulin combined with iodized water feeding in mice of other groups. At the end of modeling, the mice in the normal control group and model control group were given 0.5 mL of drinking water by gavage every day, and the mice in the low, medium and high dose groups of Jianpi Xiaoying Formula were given aqueous solution

[基金项目] 上海市浦东新区卫健委学科建设项目(PWZy2020-09);上海市浦东新区卫健委领先人才培养计划项目(PWR12021-06)

[作者简介] 刘梦冉,女,在读硕士生,主要从事中西医结合防治肥胖及糖尿病前期的基础研究

[通信作者] 李晓华,主任医师,博士生导师;E-mail: wendylee\_tcm@shutcm.edu.cn。张宏利,副主任医师,硕士生导师;E-mail: hongliting@sina.com

收稿日期:2023-09-05;修回日期:2023-12-18

of Jianpi Xiaoying Formula granules (with the doses of 8.632 g/kg, 17.264 g/kg and 34.528 g/kg respectively) by gavage every day, for consecutive 6 weeks. At the end of intervention, the levels of serum thyroid peroxidase antibody (TPOAb), thyroglobulin antibody (TGAb), free triiodothyronine (FT3), free thyroxine (FT4) and thyrotropin (TSH) in mice were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); the proportions of Th1, Th2, Th17 and regulatory T cell (Treg) in peripheral blood of mice were detected by flow cytometry; the gene expressions of tumor necrosis factor- $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* ),  $\gamma$  interferon (*IFN- $\gamma$* ), interleukin-17 (*IL-17*), *T-bet* and *ROR $\gamma$ -t* were detected by real-time fluorescence quantitative PCR; the protein expressions of T-bet and ROR $\gamma$ -t in spleen tissues were detected by Western blot; the pathological and morphological changes of thyroid tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining.

**Results:** ① Compared with the model control group, the level of serum TPOAb of mice in the high dose group of Jianpi Xiaoying Formula was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and the level of TGAb of mice in the low and high dose groups of Jianpi Xiaoying Formula was also significantly decreased ( $P < 0.05$ ). ② Compared with the model control group, the serum FT3 and FT4 levels of mice in the high dose group of Jianpi Xiaoying Formula were significantly increased ( $P < 0.05$ ). ③ Jianpi Xiaoying Formula can improve the structure and colloid of thyroid follicles, make the follicle morphology regular, and reduce the degree of infiltration of inter-follicular lymphocytes and plasma cells in thyroid of the HT model mice. ④ Compared with the model control group, the Th1 ratio in peripheral blood of mice in the low, medium and high dose groups of Jianpi Xiaoying Formula was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and the Th17 ratio of mice in the low and high dose groups of Jianpi Xiaoying Formula was also significantly decreased ( $P < 0.05$ ). ⑤ Compared with the model control group, the relative expressions of *T-bet* and *ROR $\gamma$ -t* genes in the spleen tissues of mice in the low, medium and high dose groups of Jianpi Xiaoying Formula were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), the protein expressions of T-bet and ROR $\gamma$ -t in the high dose group of Jianpi Xiaoying Formula were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and the protein expression of T-bet in the medium dose group of Jianpi Xiaoying Formula was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). ⑥ Compared with the model control group, the relative expressions of *TNF- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$*  and *IL-17* genes of mice in each dose groups of Jianpi Xiaoying Formula were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Jianpi Xiaoying Formula can inhibit the inflammatory response by down-regulating the transcription and differentiation of Th1 and Th17 and the secretion of their related inflammatory factors, thus improve HT.

**KEYWORDS** Hashimoto's thyroiditis; Jianpi Xiaoying Formula; helper T cell 1; helper T cell 17

桥本甲状腺炎 (Hashimoto's thyroiditis, HT) 又称慢性淋巴细胞性甲状腺炎, 是一种最常见的自身免疫性甲状腺疾病, 以甲状腺过氧化物酶抗体 (TPOAb) 和甲状腺球蛋白抗体 (TGAb) 升高为主要特点, 并伴有甲状腺淋巴细胞浸润<sup>[1]</sup>。HT 发病是一个复杂的自身免疫过程, 可由外界环境触发, 亦受到遗传易感性和免疫功能下降等的影响<sup>[2]</sup>。研究表明, T 细胞介导的免疫反应在 HT 发病中起重要作用, 其中由 CD4<sup>+</sup> T 细胞分化而来的辅助性 T 细胞 (Th) 1/Th2、Th17/调节性 T 细胞 (Treg) 比例与 HT 发病进展关系密切<sup>[3-4]</sup>。Th1 激活巨噬细胞和细胞毒性淋巴细胞, 间接损害甲状腺滤泡细胞, 其产生的肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和  $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 可以抑制甲状腺细胞中碘化钠同运体及其基因的转录, 且抑制甲状腺细胞生长及碘与甲状腺球蛋白的结合, 从而减少甲状腺球蛋白的合成<sup>[5]</sup>。Th2 参与介导体液免疫反应, 在动物试验中 Th2 产生的主要细胞因子白介素 (IL)-4 对 HT 的发展具有保护作用<sup>[3]</sup>。Th17 本身能够促进自身免疫炎症反应的发生<sup>[6]</sup>, 其主要细胞因子 IL-17 不仅能直接作用于上皮细胞、成纤维细胞和巨噬细胞引起甲状腺组织损伤<sup>[7]</sup>, 还能促进多种炎性细胞因子和趋化因子的产

生, 加剧甲状腺组织的炎症反应<sup>[8]</sup>。Treg 是一种重要的免疫调节细胞, 通过抑制其他免疫细胞活性来维持免疫平衡和免疫耐受, 保护组织损伤, 其主要分泌 IL-10、转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 等细胞因子, 与 HT 等多种免疫性疾病的发病机制密切相关<sup>[9]</sup>。此外, 在炎症环境中, 各种炎性因子和炎症介质可刺激 Th17 的分化和功能, 抑制 Treg 的活性<sup>[10]</sup>。可见, Th1/Th2、Th17/Treg 及其相关细胞因子在 HT 的进展中具有十分重要的作用。

上海中医药大学附属龙华医院唐红教授基于多年临床经验拟定健脾消瘿方, 临床用于治疗 HT 疗效良好<sup>[11]</sup>。然而, 该方具体机制尚不明确, 故本研究拟通过动物实验探讨健脾消瘿方是否通过调节 Th 比例来改善 HT, 其结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 动物 SPF 级 CBA/J 小鼠, 雌性, 体质量 22~28 g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 动物合格证号: SYXK (沪) 2022-0012。严格按照动物饲养规范分笼饲养, 室温保持在 22~25 °C, 相对湿度为 47%~55%, 光照周期为 12 h, 自由进食饮水。所有

动物实验方案均经上海斯莱克实验动物有限公司伦理委员会审查批准,伦理批号:20220714011。

1.1.2 药物 健脾消瘿方组成:黄芪 15 g,党参 15 g,白术 15 g,茯苓 15 g,莪术 10 g,白芥子 10 g,牛蒡子 10 g,夏枯草 15 g,白花蛇舌草 15 g,地锦草 15 g,灵芝 10 g,香附 10 g,仙灵脾 10 g,炙甘草 6 g;上述药物均由上海中医药大学附属第七人民医院制剂室代加工制为免煎颗粒。

1.1.3 试剂 抗 TPOAb 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(货号:MM-0209M2)、抗 TGAb ELISA 试剂盒(货号:MM-1058M2)、促甲状腺素(TSH)ELISA 试剂盒(货号:MM-0564M2)、游离三碘甲状腺原氨酸(FT3)ELISA 试剂盒(货号:MM-45652M2)、游离甲状腺素(FT4)ELISA 试剂盒(货号:MM-0576M2),江苏酶免实业有限公司;苏木素(货号:H3136)、伊红(货号:E4009),美国 Sigma 公司;维甲酸相关孤儿受体  $\gamma$ -t(ROR $\gamma$ -t)抗体(货号:14-6981-82)、转录因子 T-bet 抗体(货号:14-5825),美国 Invitrogen 公司; $\beta$ -Actin 抗体(货号:4970S)、抗兔二抗(货号:97074)、抗小鼠二抗(货号:7076S)、抗大鼠二抗(货号:7077S),美国 CST 公司;抗小鼠 CD4 FITC 流式抗体(货号:553046)、抗小鼠 IL-17A PE 流式抗体(货号:559502)、抗小鼠 Foxp3 APC 流式抗体(货号:17-5773-82)、抗小鼠 IFN- $\gamma$  BV650 流式抗体(货号:563854),美国 BD 公司。

1.1.4 仪器 TP1020 型脱水机、RM2235 型病理切片机,上海莱卡仪器有限公司;BMJ-IB 型包埋机,天津天利航空机电有限公司;RT-6100 型酶标仪,深圳雷杜生命科学股份有限公司;TG16W 型离心机,长沙湘智离心机仪器有限公司;HT-111B 型恒温摇床,上海赫田科学仪器有限公司;Celesta 型流式细胞仪,美国 BD 公司;5424R 型离心机,德国 Eppendorf 公司;5200 型显影仪,上海天能科技有限公司;NC2000 型微量分光光度计,美国 Thermo Fisher 公司。

1.2 分组与造模 将 40 只雌性小鼠随机分为 5 组:正常对照组、模型对照组及健脾消瘿方低、中、高剂量组,每组 8 只。除正常对照组外,其余小鼠构建实验性自身免疫性甲状腺炎(EAT)小鼠模型。模型构建方法:采用猪甲状腺球蛋白与弗氏佐剂免疫注射联合高碘水(0.64 g/L)喂养制备 EAT 小鼠模型。模型小鼠首次免疫:将猪甲状腺球蛋白溶于 PBS 缓冲液中,制成 2 mg/mL 的溶液,与 1 mL 完全弗氏佐

剂等体积混合,充分融合成油包水制剂,于小鼠 8 周龄时在其颈背部皮下多点注射,每只小鼠注射 100  $\mu$ g(即 0.1 mL 油包水制剂),正常对照组小鼠注射同等剂量(0.1 mL)0.9% NaCl 溶液,1 周 2 次,中间间隔 2 d。二次免疫:将上述猪甲状腺球蛋白溶液与等体积不完全弗氏佐剂混合制成油包水制剂,在小鼠颈背部皮下注射行再次免疫,每只小鼠注射的剂量为 100  $\mu$ g(即 0.1 mL 油包水制剂),正常对照组小鼠注射同等剂量(0.1 mL)0.9% NaCl 溶液,每周 1 次,连续注射 3 周。造模过程中造模小鼠持续给予高碘水(0.64 g/L)喂养。免疫结束后,采用 ELISA 检测小鼠血清 TPOAb、TGAb 水平,上述抗体水平显著升高视为造模成功。

1.3 干预方法 造模结束后,正常对照组与模型对照组小鼠每天给予 0.5 mL 饮用水灌胃,连续 6 周。给药组小鼠的给药量参照人与动物之间体表面积比例换算表<sup>[12]</sup>计算,分别给予低、中、高剂量的健脾消瘿方颗粒剂水溶液灌胃,连续 6 周,低、中、高剂量的健脾消瘿方颗粒剂相对应的生药剂量为 8.632 g/kg、17.264 g/kg、34.528 g/kg。

1.4 检测项目与方法 给药结束后,小鼠禁食 10 h,腹腔注射 1% 戊巴比妥钠进行麻醉,摘眼球取血,用 EP 管和肝素钠采血管收集血液,全血放置 4 h 后,4  $^{\circ}$ C 离心机 3 500 r/min 离心 15 min,吸取上清液于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存;迅速取出小鼠脾脏组织进行液氮速冻,后转移至 -80  $^{\circ}$ C 冰箱保存待测。

1.4.1 血清 TPOAb、TGAb 及甲状腺功能指标检测 采用 ELISA 检测小鼠血清 TPOAb、TGAb、FT3、FT4、TSH 水平。取上述小鼠血清,按照试剂盒说明书检测血清 TPOAb、TGAb、FT3、FT4、TSH 含量,使用自动酶标仪测定样本与标准品吸光度后绘制标准曲线,并计算出样本浓度。

1.4.2 甲状腺组织病理形态学观察 小鼠取血完成后,快速分离甲状腺组织于 10% 福尔马林中固定,乙醇梯度脱水,梯度二甲苯透明,石蜡包埋切片,苏木素-伊红(HE)染色后显微镜下观察并拍照。

1.4.3 外周血 Th1、Th2、Th17、Treg 比例检测 采用流式细胞术检测小鼠外周血 Th1、Th2、Th17、Treg 比例。给药结束后,取新鲜肝素钠抗凝血 100  $\mu$ L,每样本加入 1 mL 1 $\times$ Lysing Buffer 反应 10 min,离心机 1 000 r/min 离心 5 min,去上清后加入 1 mL PBS,重复洗 2 遍,后加入 1 mL PBS 重悬。向单阳管各加入 100  $\mu$ L 样本,依次按照说明书加入对应的荧光抗

体,2~8 °C避光孵育 15 min。随后加入 1 mL PBS 清洗细胞,离心机 1 000 r/min 离心 5 min,400 μL 重悬,上流式细胞仪。

1.4.4 相关基因表达检测 采用实时荧光定量 PCR 检测相关基因表达。取小鼠脾脏组织,每 25 mg 组织和 1 mL TRIzol 加入均浆管,每管 2~3 粒磁珠,匀质仪匀浆 5 min 后取出,按步骤提取脾脏组织总 RNA,按试剂盒说明配制反应体系,反转录为 cDNA(反应条件:65 °C 5 min,37 °C 5min,37 °C 15 min,50 °C 5 min,98 °C 5 min)。按照试剂盒说明书配制荧光定量 PCR 反应体系,将混合好的溶液按序加入 384 孔板中,每基因重复 3 次点样,完成后上机进行检测,数据导出后采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  分析目的基因的相对表达量。相关基因引物序列见表 1。

表 1 相关基因引物序列

Tab. 1 Related gene primer sequences

基因名称	引物序列
TNF-α	上游:5'-CTTCTCATTCTGCTTGTGGC-3'
	下游:5'-CCACTTGGTGGTTTGTGACTG-3'
IFN-γ	上游:5'-TTGCCAAGTTTGGAGTCAACAA-3'
	下游:5'-CGCTTCCTGAGGCTGGATTTC-3'
T-bet	上游:5'-GGAGCCCACAAGCCATTACA-3'
	下游:5'-ACATATAAGCGGTTCCCTGGC-3'
IL-17	上游:5'-GTTCTGCTATTGATTTTCAGC-3'
	下游:5'-GAACCCCTTTACACCTTCTTT-3'
RORγ-t	上游:5'-GCCTTCCCTCCACTCTATAAAG-3'
	下游:5'-AGAAAGTTGCTTCTCCTCCAG-3'
GAPDH	上游:5'-CATCACTGCCACCCAGAAGACTG-3'
	下游:5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG-3'

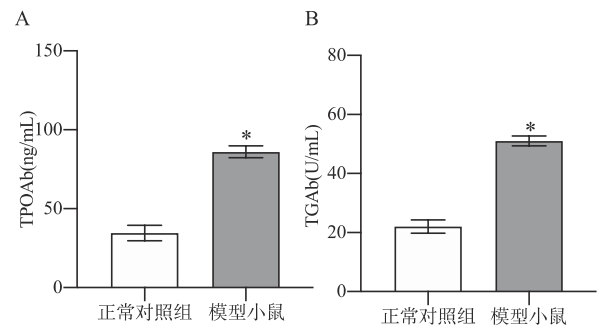
1.4.5 脾脏组织 T-bet、RORγ-t 蛋白表达 采用 Western blot 法检测脾脏组织 T-bet、RORγ-t 蛋白表达。取小鼠脾脏组织,将脾脏组织与 RIPA(含 PMSF)[每 20 mg 脾脏组织加 1 mL RIPA(含 PMSF)]一同置于均浆管匀浆 5 min 后,13 000 r/min 离心 15 min 后取上清液。采用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。10%SDS-PAGE 电泳后,蛋白质转移至 PVDF 膜,脱脂牛奶封闭 1 h,TBST 洗涤 3×10 min/次,后加入 β-actin(1:1 000)、T-bet(1:250)、RORγ-t(1:250)抗体,4 °C 孵育过夜;TBST 洗涤 3×10 min/次,加入抗兔/小鼠/大鼠二抗(1:1 000),室温孵育 1 h;加入 ECL 发光显影液曝光拍照,Image J 软件分析。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,符合正态分布及方差

齐性检验数据采用单因素方差分析(One-way ANOVA)中的最小显著性法(LSD 法),不符合正态分布及方差齐性检验数据采用非参数检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 HT 模型构建 经过 4 周造模处理后,与正常对照组相比,模型小鼠的血清 TPOAb、TGAb 水平均显著升高( $P < 0.05$ ),可认为小鼠 HT 模型构建成功。见图 1。



A 为正常对照组与模型小鼠 TPOAb 水平比较,B 为正常对照组与模型小鼠 TGAb 水平比较。与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ 。正常对照组  $n=8$ ,模型小鼠  $n=32$ ; $\bar{x} \pm s$ 。

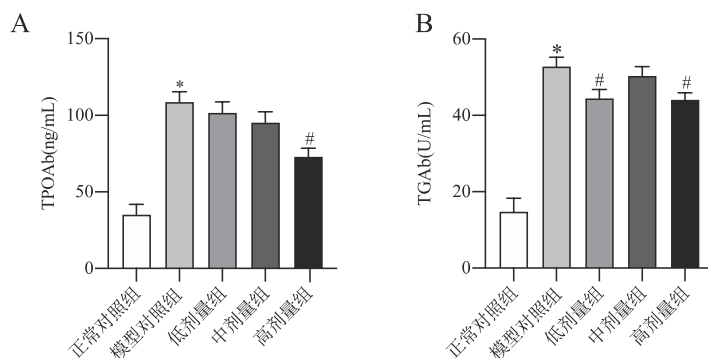
图 1 免疫造模对小鼠甲状腺抗体的影响

Fig. 1 Effect of immunomodeling on thyroid antibodies in mice

2.2 对血清 TPOAb、TGAb 水平的影响 与正常对照组相比,模型对照组小鼠血清 TPOAb、TGAb 水平显著升高( $P < 0.05$ );与模型对照组相比,健脾消瘦方高剂量组小鼠血清 TPOAb 水平显著降低( $P < 0.05$ ),健脾消瘦方低、高剂量组小鼠的 TGAb 水平亦显著降低( $P < 0.05$ )。见图 2。

2.3 对甲状腺功能指标的影响 与正常对照组相比,模型对照组小鼠血清 FT3、FT4 水平显著下降( $P < 0.05$ ),TSH 水平显著升高( $P < 0.05$ );与模型对照组相比,健脾消瘦方高剂量组小鼠血清 FT3、FT4 水平明显上升( $P < 0.05$ ),给药组小鼠的 TSH 水平呈一定的下降趋势,但其差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 3。

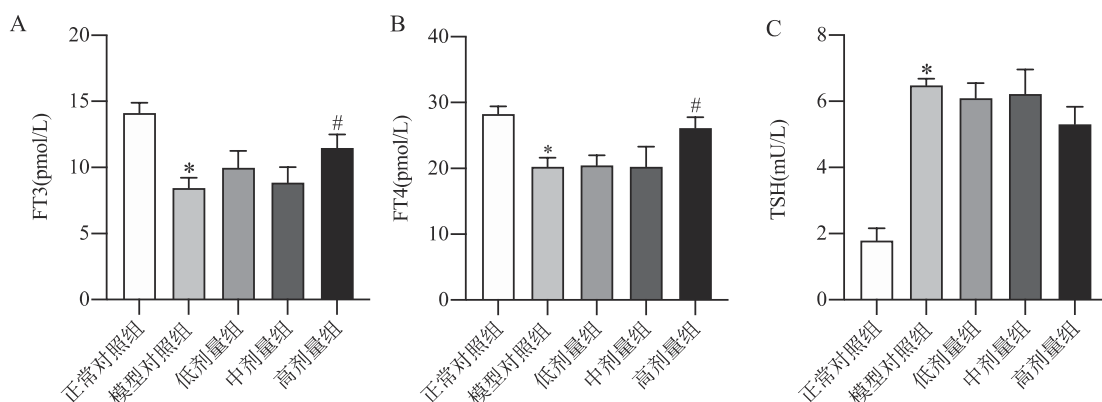
2.4 对甲状腺组织病理形态的影响 正常对照组小鼠的甲状腺组织完整性保持良好,甲状腺结构完整,圆形或椭圆形的甲状腺上皮细胞大小均匀、排列整齐,每个滤泡内含有被均匀染成粉色的胶质,无淋巴细胞或浆细胞浸润。模型对照组小鼠的甲状腺组织明显被破坏,部分甲状腺滤泡萎缩或缺失,有明显的



A 为各组小鼠血清 TPOAb 水平比较, B 为各组小鼠血清 TGAb 水平比较。与正常对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与模型对照组比较, # $P < 0.05$ 。  $n = 5, \bar{x} \pm s$ 。

图 2 各组小鼠甲状腺抗体水平比较

Fig. 2 Comparison of levels of thyroid antibodies in mice of each group



A 为各组小鼠血清 FT3 水平比较, B 为各组小鼠血清 FT4 水平比较, C 为各组小鼠血清 TSH 水平比较。与正常对照组相比, \* $P < 0.05$ ; 与模型对照组相比, # $P < 0.05$ 。  $n = 5, \bar{x} \pm s$ 。

图 3 各组小鼠甲状腺功能指标水平比较

Fig. 3 Comparison of levels of thyroid function indicators in mice of each group

淋巴细胞浸润。健脾消瘦方干预组与模型对照组相比,甲状腺病变减少,整体结构相对完整,滤泡形态较为均一,滤泡内偶有浆细胞浸润,且高剂量组小鼠的甲状腺组织改善最为明显。见图 4。

### 2.5 对外周血 Th1、Th2、Th17、Treg 比例的影响

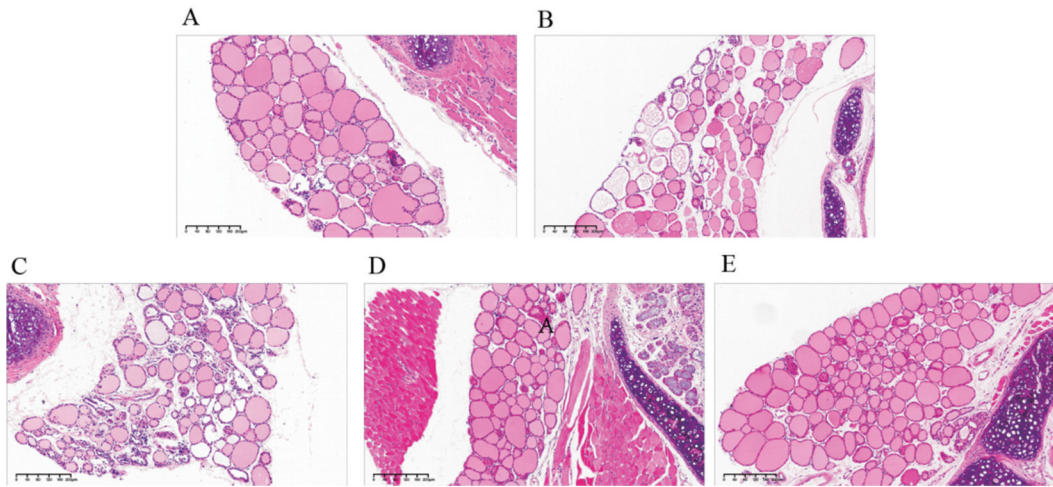
与正常对照组相比,模型对照组小鼠外周血 Th1 比例明显上升( $P < 0.05$ );与模型对照组相比,健脾消瘦方低、中、高剂量组小鼠的外周血 Th1 比例均显著下降( $P < 0.05$ )。各组小鼠的外周血 Th2 比例比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与正常对照组相比,模型对照组小鼠外周血 Th17 比例明显上升( $P < 0.05$ );与模型对照组相比,健脾消瘦方低、高剂量组小鼠的 Th17 比例显著降低( $P < 0.05$ )。与正常对照组相比,模型对照组小鼠外周血 Treg 比例明显降低( $P < 0.05$ );但与模型对照组相比,各给药组小鼠的外周血 Treg 比例未发生明显变化( $P > 0.05$ )。见图 5。

### 2.6 对脾脏组织 T-bet、ROR $\gamma$ -t 表达的影响

与正常对照组相比,模型对照组小鼠的脾脏组织 T-bet、ROR $\gamma$ -t 基因相对表达量显著上升( $P < 0.05$ );与模型对照组相比,健脾消瘦方低、中、高剂量组的 T-bet、ROR $\gamma$ -t 基因相对表达量均明显下降( $P < 0.05$ )。与正常对照组相比,模型对照组小鼠的脾脏组织 T-bet、ROR $\gamma$ -t 蛋白表达显著上升( $P < 0.05$ );与模型对照组相比,健脾消瘦方高剂量组的 T-bet、ROR $\gamma$ -t 蛋白表达均显著下降( $P < 0.05$ ),中剂量组的 T-bet 蛋白表达亦显著下降( $P < 0.05$ )。见图 6。

### 2.7 对脾脏组织 Th1、Th17 相关细胞因子表达的影响

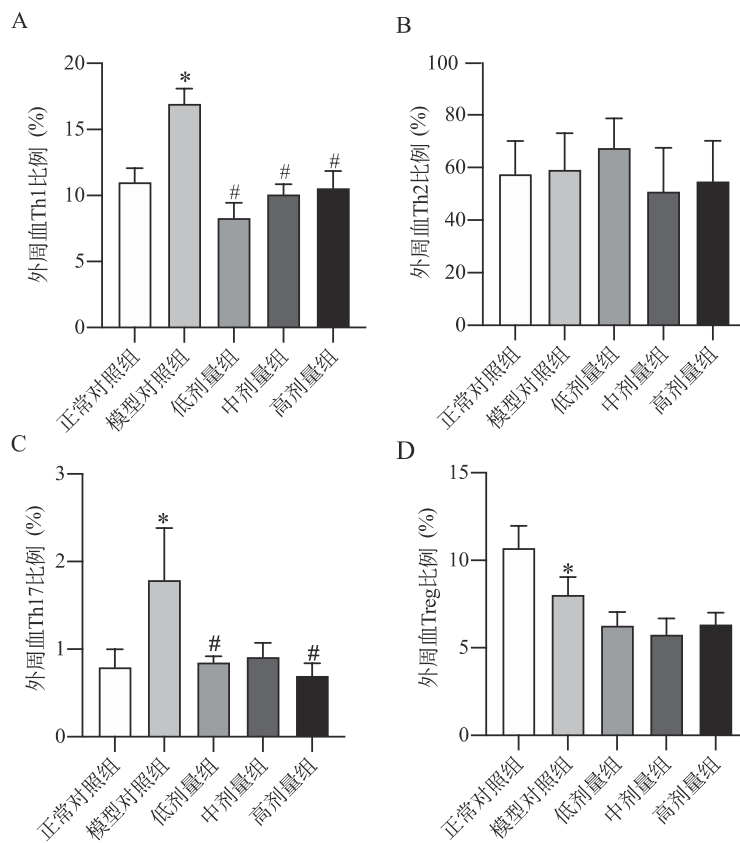
与正常对照组相比,模型对照组小鼠脾脏组织的 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17 基因相对表达量均显著升高( $P < 0.05$ );与模型对照组相比,健脾消瘦方各剂量组小鼠脾脏组织的 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17 基因相对表达量均明显降低( $P < 0.05$ )。见图 7。



A 为正常对照组, B 为模型对照组, C 为健脾消痰方低剂量组, D 为健脾消痰方中剂量组, E 为健脾消痰方高剂量组。

图 4 各组小鼠甲状腺病理形态变化(HE 染色, ×100)

Fig. 4 Changes of pathological morphology of thyroid gland in mice of each group (HE staining, ×100)



A 为各组小鼠外周血 Th1 比例比较, B 为各组小鼠外周血 Th2 比例比较, C 为各组小鼠外周血 Th17 比例比较, D 为各组小鼠外周血 Treg 比例比较。与正常对照组比较, \*P<0.05; 与模型对照组比较, #P<0.05。n=4,  $\bar{x} \pm s$ 。

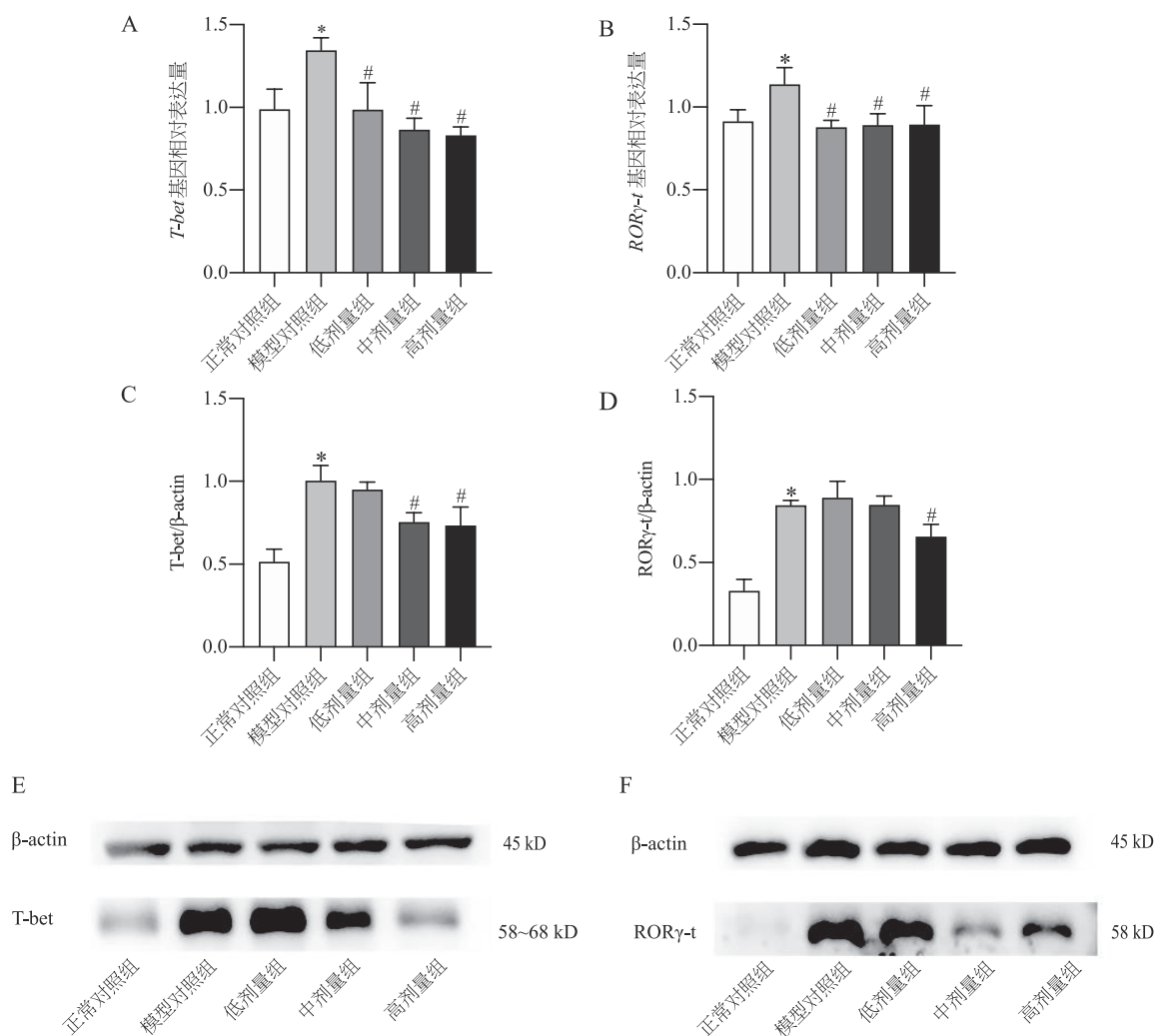
图 5 各组小鼠外周血免疫细胞比例比较

Fig.5 Comparison of proportion of immune cells in peripheral blood in mice of each group

### 3 讨论

HT 是人类最常见的自身免疫性疾病之一, 其发病率呈逐年上升趋势<sup>[13]</sup>。目前临床中尚无公认

有效的治疗 HT 的方法, 多采用药物对症治疗, 不仅疗效不明确, 且副作用较多<sup>[14]</sup>。中医药治疗 HT 可通过调节免疫细胞比例及相关细胞因子等, 有效改



A 为各组小鼠脾脏组织 *T-bet* 基因相对表达量比较, B 为各组小鼠脾脏组织 *RORγ-t* 基因相对表达量比较, C 为各组小鼠脾脏组织 T-bet 蛋白表达量比较; D 为各组小鼠脾脏组织 RORγ-t 蛋白表达量比较; E 为各组小鼠脾脏组织 T-bet 蛋白表达条带; F 为各组小鼠脾脏组织 RORγ-t 蛋白表达条带。与正常对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与模型对照组比较, # $P < 0.05$ 。  $n = 5, \bar{x} \pm s$ 。

图 6 各组小鼠脾脏组织 T-bet、RORγ-t 基因及蛋白表达比较

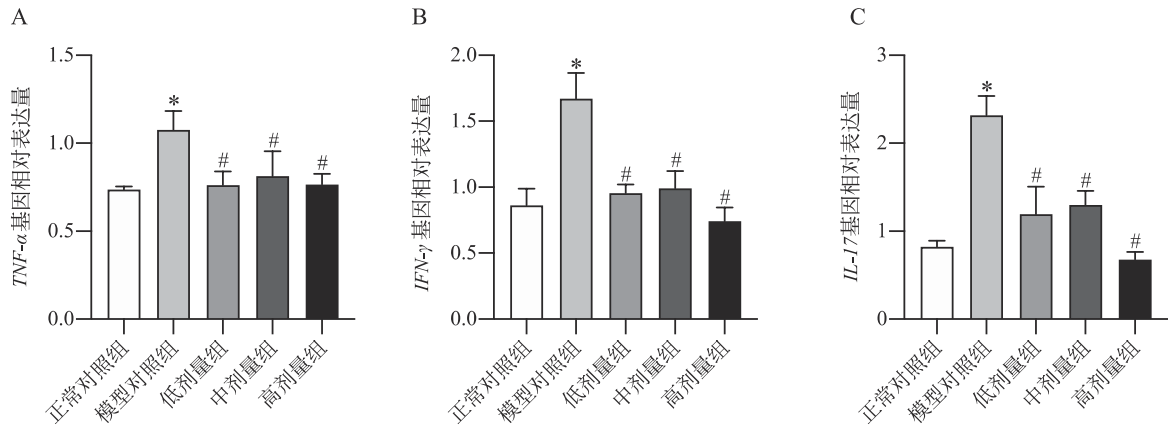
Fig. 6 Comparison of expressions of T-bet and RORγ-t genes and proteins in mice of each group

善 HT 的症状及体征<sup>[15-16]</sup>。

在中医学中, HT 属于“瘰疬”范畴, 其主要病机为气滞、血瘀、痰凝壅结于颈前。“脾气亏虚乃病机关键, 郁火内生贯穿其中”, 此为 HT 的发病特点<sup>[17]</sup>。健脾消瘰方以黄芪为君药, 补气升阳; 以党参、茯苓、白术、甘草为臣药, 取四君子汤益气健脾之意; 佐以莪术、白芥子、夏枯草、牛蒡子、白花蛇舌草、地锦草, 清热解毒、化痰、消肿散结; 使药为香附、灵芝、仙灵脾。全方共奏益气健脾、清解郁热、消瘰散结之效<sup>[18]</sup>。相关临床研究表明, 健脾消瘰方可降低脾气亏虚型 HT 患者的 TPOAb、TGAb 滴度, 减轻炎症浸润, 从而达到阻止病情发展的目的<sup>[19]</sup>。

本研究采用多点注射佐剂抗原联合高碘水喂养构建 HT 小鼠模型, 造模成功后给予健脾消瘰方颗粒剂水溶液灌胃干预 6 周, 然后进行相关机制探索。研究表明, 高剂量健脾消瘰方可有效降低模型小鼠的血清 TPOAb、TGAb 水平, 升高血清 FT3、FT4 水平, 改善甲状腺组织病理形态; 同时, 高剂量健脾消瘰方可显著降低外周血 Th1、Th17 比例, 下调 Th1、Th17 转录因子 T-bet、RORγ-t 基因及蛋白的表达水平, 并下调促炎细胞因子 *TNF-α*、*IFN-γ*、*IL-17* 基因相对表达量。

在 HT 发病过程中, Th1 能够通过激活巨噬细胞、自然杀伤细胞等免疫细胞来增强炎症介质的产



A 为各组小鼠 *TNF-α* 基因相对表达量比较,B 为各组小鼠 *IFN-γ* 基因相对表达量比较,C 为各组小鼠 *IL-17* 基因相对表达量比较。与正常对照组比较,\* $P<0.05$ ;与模型对照组比较,# $P<0.05$ 。 $n=5,\bar{x}\pm s$ 。

图 7 各组小鼠脾脏组织 Th1、Th17 相关细胞因子表达比较

Fig. 7 Comparison of expressions of Th1 and Th17 related cytokines in mice of each group

生,导致甲状腺组织炎症反应和细胞损伤<sup>[3]</sup>,其分泌的 *IFN-γ* 不仅能激活免疫炎症反应、促进细胞介导的免疫应答,还能抑制甲状腺细胞的功能,干扰甲状腺激素的合成和释放,导致甲状腺功能减退<sup>[2]</sup>。Th17 分泌的细胞因子 *IL-17* 可直接引起甲状腺组织的损伤,并通过促进多种炎症因子的分泌加重甲状腺组织炎症浸润<sup>[20]</sup>;此外,Th17 本身和 *IL-17* 均可激活树突状细胞和其他免疫细胞,增强抗原呈递和免疫细胞活化,从而增加自身免疫攻击甲状腺组织的可能性<sup>[6]</sup>。相关研究表明,在 HT 患者的甲状腺组织中,*IL-17A* 表达较强,这可能与 Th17 在甲状腺浸润有关,同时 *RORγ-t* 在甲状腺组织中转录增多<sup>[21]</sup>。

CD4<sup>+</sup> T 细胞的转化过程离不开特异性转录因子,T-bet 和 *RORγ-t* 分别是 Th1 和 Th17 的特异性转录因子。本研究发现,相较于模型对照组,健脾消癆方高剂量组小鼠的 Th1、Th17 比例均显著下降,且调控这两种免疫细胞分化的转录因子 T-bet、*RORγ-t* 在蛋白和基因水平上均显著下降,两种免疫细胞的主要相关细胞因子 *IFN-γ*、*TNF-α* 和 *IL-17* 水平亦显著下降。基于此我们推测,健脾消癆方可能通过下调 Th1、Th17 两种免疫细胞分化,并降低其相关炎症因子水平,进而达到治疗 HT 的目的。相关临床研究显示,健脾消癆方通过纠正 Th1/Th2 细胞失衡改善 HT 女性患者的临床症状<sup>[11]</sup>。然而,在本研究中模型对照组未出现 Th2 比例明显下调,给药组亦未出现 Th2 比例明显变化,这可能是由于本研究所构建的动物模型与临床 HT 仍存在一定

差异。

此前 HT 模型小鼠相关研究表明,极高浓度的碘摄入可能会诱导 Th1 极化,但低水平的碘摄入可促进 Th17 的分化<sup>[22]</sup>。由于本研究在模型构建过程中对小鼠使用了高碘水喂养,这可能导致 HT 小鼠 Th1 增加同时 Th17 也增加。

综上所述,健脾消癆方干预 HT 模型小鼠具有良好的效果,能通过下调 Th1、Th17 的转录分化及其相关炎症因子的分泌,抑制机体的炎症反应,改善 HT。

#### 参考文献:

- [1] RALLI M, ANGELETTI D, FIORE M, et al. Hashimoto's thyroiditis: An update on pathogenic mechanisms, diagnostic protocols, therapeutic strategies, and potential malignant transformation[J]. *Autoimmun Rev*, 2020, 19(10): 102649.
- [2] ANTONELLI A, FERRARI S M, CORRADO A, et al. Autoimmune thyroid disorders[J]. *Autoimmun Rev*, 2015, 14(2): 174-180.
- [3] JANYGA S, MAREK B, KAJDANIUK D, et al. CD4<sup>+</sup> cells in autoimmune thyroid disease [J]. *Endokrynol Pol*, 2021, 72(5): 572-583.
- [4] MATIA-GARCIA I, VADILLO E, PELAYO R, et al. Th1/Th2 Balance in Young Subjects: Relationship with Cytokine Levels and Metabolic Profile[J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 6587-6600.
- [5] LUTY J, RUCKEMANN-DZIURDZIŃSKA K, WITKOWSKI J M, et al. Immunological aspects of autoimmune thyroid disease—Complex interplay between cells and cytokines[J]. *Cytokine*, 2019, 116: 128-133.
- [6] WANG Y, FANG S, ZHOU H. Pathogenic role of Th17 cells in autoimmune thyroid disease and their underlying mechanisms [J].

- Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2023, 37(2): 101743.
- [7] ZHANG W, LIU X, ZHU Y, et al. Transcriptional and posttranslational regulation of Th17/Treg balance in health and disease[J]. Eur J Immunol, 2021, 51(9): 2137-2150.
- [8] PYZIK A, GRYWALSKA E, MATYJASZEK-MATUSZEK B, et al. Immune disorders in Hashimoto's thyroiditis: what do we know so far?[J]. J Immunol Res, 2015, 2015: 979167.
- [9] RAMOS-LEVÍ A M, MARAZUELA M. Pathogenesis of thyroid autoimmune disease: the role of cellular mechanisms[J]. Endocrinol Nutr, 2016, 63(8): 421-429.
- [10] FASCHING P, STRADNER M, GRANINGER W, et al. Therapeutic Potential of Targeting the Th17/Treg Axis in Autoimmune Disorders[J]. Molecules, 2017, 22(1): 134.
- [11] 马燕云, 唐红, 杨华, 等. 健脾消癭汤治疗育龄期女性桥本甲状腺炎的临床研究[J]. 世界临床药物, 2022, 43(6): 720-725. MA Y Y, TANG H, YANG H, et al. Clinical study on Jianpi Xiaoying Decoction in the treatment of women of childbearing age with Hashimoto thyroiditis [J]. World Clinical Drug, 2022, 43(6): 720-725.
- [12] 汤家铭, 陈民利. 医学实验动物学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012: 209-211. TANG J M, CHEN M L. Medical Experimental Zoology [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2012: 209-211.
- [13] 钱晨宏, 蒋烈浩, 郑国涛, 等. 中医药治疗桥本甲状腺炎现状与进展[J]. 浙江中西医结合杂志, 2021, 31(3): 287-289. QIAN C H, JIANG L H, ZHENG G W, et al. Status and progress of traditional Chinese medicine in treatment of Hashimoto thyroiditis [J]. Zhejiang Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2021, 31(3): 287-289.
- [14] 王迪, 梁伟娟, 许雷鸣, 等. 桥本甲状腺炎西药治疗进展[J]. 医学综述, 2021, 27(22): 4501-4505. WANG D, LIANG W J, XU L M, et al. Progress of Western Medicine in Treatment of Hashimoto Thyroiditis [J]. Medical Recapitulate, 2021, 27(22): 4501-4505.
- [15] 王苹. 桥本甲状腺炎的病因和治疗研究进展[J]. 医学理论与实践, 2022, 35(15): 2556-2558. WANG P. Progress in the etiology and treatment of Hashimoto thyroiditis[J]. The Journal of Medical Theory and Practice, 2022, 35(15): 2556-2558.
- [16] 韩静, 刘守尧, 夏仲元. 中医药干预桥本氏甲状腺炎作用机制的实验研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(9): 4207-4209. HAN J, LIU S Y, XIA Z Y. Experimental research progress on the intervention mechanism of TCM on Hashimoto's thyroiditis[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2019, 34(9): 4207-4209.
- [17] 盛阳, 吴深涛. 吴深涛从“火郁发之”论治桥本甲状腺炎[J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(9): 88-89. SHENG Y, WU S T. Wu Shentao's treatment of Hashimoto thyroiditis from "Huo Yu Fa Zhi" [J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2013, 20(9): 88-89.
- [18] 付佳闻, 李晓华, 李虹, 等. 唐红教授治疗桥本氏甲状腺炎经验[J]. 福建中医药, 2020, 51(5): 50-51. FU J W, LI X H, LI H, et al. Professor Tang Hong's experience in treating Hashimoto's thyroiditis[J]. Fujian Journal of Traditional Chinese Medicine, 2020, 51(5): 50-51.
- [19] 陈秋野, 周兰, 马燕云, 等. 健脾消癭汤对脾气亏虚型桥本甲状腺炎患者的临床疗效[J]. 中成药, 2019, 41(9): 2102-2106. CHEN Q Y, ZHOU L, MA Y Y, et al. Clinical effects of Jianpi Xiaoying Decoction on patients with Hashimoto's thyroiditis due to Spleen-Qi Deficiency[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2019, 41(9): 2102-2106.
- [20] 张雪琪, 张帆, 滕卫平. 辅助性 T 细胞 17 介导桥本甲状腺炎发病机制的研究现状[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2022, 38(11): 1001-1005. ZHANG X Q, ZHANG F, TENG W P. Research advance in Hashimoto thyroiditis mediated by T helper cell 17 [J]. Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism, 2022, 38(11): 1001-1005.
- [21] WANG S, BAIDOO S E, LIU Y, et al. T cell-derived leptin contributes to increased frequency of T helper type 17 cells in female patients with Hashimoto's thyroiditis[J]. Clin Exp Immunol, 2013, 171(1): 63-68.
- [22] LI D, CAI W, GU R, et al. Th17 cell plays a role in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis in patients[J]. Clin Immunol, 2013, 149(3): 411-420.

(编辑:李欣)