

## 芪蛭消癭汤对 NOD. H-2<sup>h4</sup> 小鼠甲状腺 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群影响的实验研究

杨潇<sup>1,3</sup>, 高天舒<sup>2\*</sup>, 周喜玉<sup>3</sup>, 徐佳<sup>3</sup>, 曲金桥<sup>3</sup>

(1. 辽宁中医药大学第二附属医院, 沈阳 110034; 2. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032;  
3. 辽宁中医药大学, 沈阳 110032)

**[摘要]** 目的: 从 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群角度, 探讨芪蛭消癭汤治疗自身免疫甲状腺炎(AIT)的作用机制。方法: 60只 SPF 级 NOD. H-2<sup>h4</sup> 小鼠, 随机分成以下4组: 正常(NC)组、模型(MC)组、常规剂量芪蛭消癭汤组(ZY1, 20.8 g·kg<sup>-1</sup>)、和3倍剂量芪蛭消癭汤组(ZY3, 62.4 g·kg<sup>-1</sup>), 正常组饲以双蒸水, 其余各组自由饮用含0.05%碘化钠水8周, 8周后自发形成 AIT 动物模型, 再给处理因素8周后处死小鼠, 留取各组 NOD. H-2<sup>h4</sup> 小鼠血清、甲状腺。放免法(RIA法)测小鼠血清总三碘甲状腺原氨酸(TT3)、总甲状腺素(TT4), 固相化学发光酶免疫法(IRMA法)测定小鼠血清促甲状腺激素(TSH); 光镜下观察甲状腺细胞形态; 免疫组化法测定小鼠甲状腺  $\gamma$ -干扰素(INF- $\gamma$ )、白细胞介素-4(IL-4)蛋白表达; RT-PCR法检测小鼠甲状腺 INF- $\gamma$ 、IL-4 mRNA 表达; Western blot法测定小鼠甲状腺组织叉头翼状螺旋转录因子(Foxp3)蛋白表达。结果: 各组间血清 TT3, TT4 及 TSH 值比较无明显差异。HE染色显示 MC组甲状腺组织淋巴细胞浸润, MC组 AIT 的发生率明显高于 NC组( $P < 0.01$ )。MC组 INF- $\gamma$ 、IL-4 mRNA 及蛋白表达较 NC组显著下降( $P < 0.01$ ); 与 MC组比较, ZY1, ZY3组 INF- $\gamma$ 、IL-4 的蛋白表达升高(分别  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ); 且 ZY1组, ZY3组 INF- $\gamma$ 、IL-4mRNA 表达显著升高( $P < 0.01$ )。MC组甲状腺组织 Foxp3 的蛋白表达量较 NC组明显下降( $P < 0.01$ ); ZY1, ZY3组 Foxp3 表达较 MC组明显升高( $P < 0.01$ )。结论: 芪蛭消癭汤治疗 AIT 的机制可能与上调 INF- $\gamma$ 、IL-4, Foxp3 的表达, 影响 NOD. H-2<sup>h4</sup> 小鼠 Th1, Th2, Treg 细胞亚群水平相关。

**[关键词]** 芪蛭消癭汤; NOD. H-2<sup>h4</sup> 小鼠; 自身免疫甲状腺炎;  $\gamma$ -干扰素; 白细胞介素-4; 叉头翼状螺旋转录因子  
**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)06-0149-05  
**[doi]** 10.11653/syfj2014060149

## Effect of Qili Xiaoying Decoction on the CD4<sup>+</sup> T Cell Subsets in NOD. H-2<sup>h4</sup> Mice with Autoimmune Thyroiditis

YANG Xiao<sup>1,3</sup>, GAO Tian-shu<sup>2\*</sup>, ZHOU Xi-yu<sup>3</sup>, XU Jia<sup>3</sup>, QU Jin-qiao<sup>3</sup>

(1. The 2nd Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110034, China; 2. The Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China;  
3. Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the mechanism of Qili Xiaoying decoction on NOD. H-2<sup>h4</sup> mice with autoimmune thyroiditis (AIT) in view of CD4<sup>+</sup> T cell subsets. **Method:** Sixty SPF NOD. H-2<sup>h4</sup> mice were randomly divided into four groups, the normal control group (NC), the model control group (MC), the Qili Xiaoying decoction group (ZY1, 20.8 g·kg<sup>-1</sup>) and the 3 times dose of Qili Xiaoying decoction group (ZY3, 62.4 g·kg<sup>-1</sup>). The NC group received sterile water, and the others were administrated with 0.05% NaI for 8 weeks to induce AIT. All mice were sacrificed at the time point of giving treatment factors for 8 weeks. The serum

**[收稿日期]** 20130828(010)

**[基金项目]** 沈阳市科技局计划(F10-205-1-31); 辽宁省教育厅优秀人才计划(LR201026); 教育部博士点基金项目(20092133110004)

**[第一作者]** 杨潇, 博士研究生, 主治医师, 从事中西医结合防治甲状腺疾病研究, Tel: 18004016667, E-mail: 17924948@qq.com

**[通讯作者]** \* 高天舒, 博士, 博士生导师, 主任医师, 从事中西医结合防治内分泌代谢疾病, Tel: 024-31961962, E-mail: gaotianshu67@163.com

triiodothyronine (TT3) and thyroxine (TT4) were detected by RIA method, the serum thyroid-stimulating hormone (TSH) by IRMA. Thyrocyte morphology was observed under optical microscopy. Immunohistochemistry staining was conducted to analyze the expression of INF- $\gamma$  and IL-4. The expression of INF- $\gamma$  mRNA and IL-4 mRNA in NOD. H-2<sup>h4</sup> mice thyroid was detected by Real-time (RT)-PCR, and the Foxp3 expressions in the NOD. H-2<sup>h4</sup> mice thyroid were determined by Western blot. **Result:** ① No apparent differences among every group in serum TT3, TT4 and TSH were found. ② Lymphocytic infiltration could be found by HE staining, AIT occurrence rate of MC was obviously higher than the NC ( $P < 0.01$ ). ③ Compared with the NC group, expression of INF- $\gamma$  mRNA, IL-4 mRNA and protein in the MC decreased markedly ( $P < 0.01$ ); compared to the MC, the protein expression of INF- $\gamma$  and IL-4 both in ZY1 and ZY3 were increased (respectively  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). The expression of INF- $\gamma$  mRNA and IL-4 mRNA in ZY1 and ZY3 were also increased remarkably ( $P < 0.01$ ). ④ The protein expressions of Foxp3 in the MC declined markedly compared with the NC ( $P < 0.01$ ); the Foxp3 expression in ZY1 and ZY3 ascended remarkably compared with the MC ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The therapeutic mechanism of Qili Xiaoying decoction on NOD. H-2<sup>h4</sup> with AIT may be related to influencing the cell subsets of Th1, Th2, Treg by up-regulating the expression of INF- $\gamma$ , IL-4 and Foxp3.

[**Key words**] Qili Xiaoying decoction; NOD. H-2<sup>h4</sup> mice; AIT; INF- $\gamma$ ; IL-4; Foxp3

自身免疫甲状腺炎(AIT)是典型的器官特异性自身免疫疾病,由 CD4<sup>+</sup>T 细胞介导发生,其特征主要表现为甲状腺内淋巴细胞浸润和血清甲状腺自身抗体<sup>[1]</sup>。CD4<sup>+</sup>T 细胞是免疫系统中最重要免疫调节细胞,对维持机体的免疫平衡发挥重要作用,包括 T 辅助细胞 1(Th1)、T 辅助细胞 2(Th2)、T 辅助细胞 17(Th17)、调节性 T 细胞(Treg)等细胞亚群。导师高天舒教授采用益气活血化痰法治疗 AIT 取得了不少成果,不仅能减轻症状、改善生活质量,而且能降低血清甲状腺自身抗体水平<sup>[2]</sup>,但其免疫学机制尚不清楚,是否通过调节不同 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群而起到治疗 AIT 的作用尚不清楚,也未见类似报道。故本研究以 AIT 的理想动物模型 NOD. H-2<sup>h4</sup> 小鼠<sup>[3]</sup>为研究对象,旨在观察  $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )、白细胞介素-4(IL-4)及叉头翼状螺旋转录因子(Foxp3)在 AIT 发病及芪蛭消瘦汤治疗后的变化特点,从不同的 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群角度进一步探讨芪蛭消瘦汤治疗 AIT 的机制。

## 1 材料

**1.1 药物** 芪蛭消瘦汤(ZY)由红参、黄芪、当归、莪术、法半夏、浙贝母、生牡蛎、鳖甲等 8 味药组成。中药饮片购自辽宁中医药大学附属医院,经浸泡、煎熬、过滤及浓缩成质量浓度为 2.0 g·mL<sup>-1</sup>。

**1.2 试剂** 兔抗小鼠 IL-4 多克隆抗体(批号 bs-0581R,北京博奥森生物技术有限公司);兔抗小鼠 INF- $\gamma$  多克隆抗体(批号 BA3383),血清 TT3(批号 S10930055)、TT4(批号 S10930056)放免试剂盒、血清 TSH 试剂盒(批号 S20083118),DAB 显色剂(批

号 SA2022)反转录试剂盒(批号 60906-10)、荧光定量 PCR 试剂盒(批号 ADA6002)均为武汉博士德生物工程有限公司;Trizol(批号 D9108),4% 多聚甲醛(批号 30525-89-4)、磷酸盐缓冲液(批号 BF-0012);兔抗小鼠 Foxp3 单克隆一抗(批号 HG11652-G)沈阳鼎国昌盛生物技术有限公司提供。

**1.3 仪器** PowerPac200 型电泳仪(美国 Bio-Rad),Mini-Protein III 型垂直板电泳装置(美国 Bio-Rad),DYY 40B 型转印电泳槽(北京六一仪器厂),小型台式离心机(美国 Sigma),31k5C 型高速冷冻离心机(美国 Sigma)、PCR 扩增仪(德国 Biometra),UV300 紫外分光光度计(英国 UV-visible Spectrometer),ABI 7500 扩增仪,DK-8B 型电热恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司),BIO-DAD 680 酶标仪、FT-2008 PS  $\gamma$  记数仪(西安核仪器厂),切片仪(德国 Leica 公司),生物显微镜(日本 Olympus)。

**1.4 动物** 雌性 8 周龄 NOD. H-2<sup>h4</sup> 小鼠 60 只,美国 Jackson 公司引进,中国医科大学内分泌代谢研究所提供,SPF 级实验室饲养。

## 2 方法

**2.1 动物分组** NOD. H-2<sup>h4</sup> 小鼠随机分为正常(NC)组、模型(MC)组、ZY1 组、ZY3 组,每组各 15 只,NC 组饲以双蒸水,其余各组自由饮用含 0.05% 碘化钠水 8 周。模型成功后给药组灌胃量分别为:ZY1 组 20.8 g·kg<sup>-1</sup>,ZY3 组 62.4 g·kg<sup>-1</sup>,药物生药量为 2.0 g·mL<sup>-1</sup>,每日 ig 1 次,每 ig 6 d 休息 1 d,连续 8 周,NC 组、MC 组灌服去离子水,8 周后取材。

**2.2 标本采集** 乙醚麻醉,眶静脉取血,分离血清,存入 1.5 mL Eppendoff 管中, -20 °C 冰柜中保存,用于甲状腺功能测定。迅速分离甲状腺,用 4% 多聚甲醛固定,做形态学观察及免疫组织化学检测;用于 RT-PCR 检测的放入 1.5 mL Eppendoff 管中,滴入 1 mL Trizol 试剂, -80 °C 保存。用于 Western blot 检测的甲状腺标本迅速放入液氮中保存备用。

**2.3 检测指标和方法**

**2.3.1 甲状腺功能测定** 血清 TSH, IRMA 法; 血清 TT<sub>3</sub>, TT<sub>4</sub>, RIA 法。

**2.3.2 小鼠甲状腺形态学** 常规方法 HE 染色, 光镜下观察各组小鼠 AIT 的发生率。AIT 发生率的判定方法:100 倍光镜下,采用 BX51FL + DP70 显微照相系统,应用 Image-ProPlus 5.1 软件测定炎细胞的浸润程度。取甲状腺最大截面积,测量整个截面内炎细胞面积。甲状腺炎的诊断标准:甲状腺腺体中炎细胞的面积与整个腺面积的比值 > 2% [4]。

**2.3.3 IFN- $\gamma$ , IL-4 免疫组织化学检测** 甲状腺组织石蜡切片常规脱蜡、水化后,用 SP 法作 IFN- $\gamma$ , IL-4 免疫组织化学染色。甲状腺组织免疫组化阳性染色是细胞膜和胞浆呈棕黄色。Image-Pro plus6.0 图像分析系统 (Media Cybernetics 公司)分析免疫组织化学染色切片,分别测量 IL-4, IFN- $\gamma$  染色区域的整合吸光度(A),同一标本 3 张切片测量值取均值。

**2.3.4 检测 NOD. H-2<sup>h4</sup> 小鼠甲状腺 IFN- $\gamma$ , IL-4 mRNA 表达** ①按照 Trizol 试剂说明书步骤严格操作,提取甲状腺细胞总 RNA,采用紫外分光光度仪测定 260,280 nm 吸光度(A),并计算 RNA 的纯度及含量。②应用反转录试剂盒合成 cDNA。取 2  $\mu$ L 总 RNA 作为 imoban, oligo-dT 做引物,反应体系为 20  $\mu$ L,反应条件为 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。③RT-PCR:PCR 循环条件为 95 °C 0.5 min 1 个循环, 95 °C 5 s, 60 °C 34 s 40 个循环, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s 1 个循环。为了消除样本提取、逆转录和 PCR 反应过程中造成的差异,同时进行管家基因  $\beta$ -actin mRNA 表达的检测。IFN- $\gamma$ , IL-4 mRNA 和内参照  $\beta$ -actin 基因扩增的引物序列均由北京华大基因公司设计并合成,引物序列见表 1。PCR 结束后,结果用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> 法来决定目的基因在各组的相对表达量。

**2.3.5 检测 NOD. H-2<sup>h4</sup> 小鼠甲状腺 Foxp3 蛋白表达** 取甲状腺标本,用玻璃匀浆器匀浆后,加入蛋白裂解液,冰上裂解 30 min, 12 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 离心 5 min,取上清。蛋白定量:紫外分光光度计比色,绘制

表 1 目的基因实时定量 RT-PCR 引物序列

基因	引物序列	长度/bp
IFN- $\gamma$	上游引物:5'-CTGAGACAATGAACGCTAC-3'	142
	下游引物:5'-TCCACATCTATGCCACT-3'	
IL-4	上游引物:5'-CATCCTGCTCTTCTTTCT-3'	113
	下游引物:5'-ATGGCGTCCCTTCTC-3'	
$\beta$ -actin	上游引物:5'-CCCATCTACGAGGGCTAT-3'	145
	下游引物:5'-TGTCACGCACGATTTC-3'	

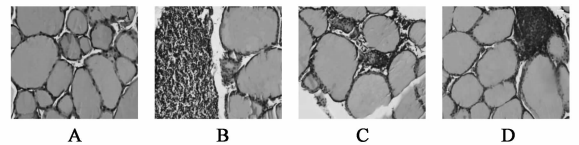
标准曲线,计算对应浓度。配制 SDS-PAGE 凝胶,同时将样品加入上样缓冲液后,沸水中煮 5 min,使蛋白充分变性。SDS-PAGE 电泳,SDS-PAGE 转膜印迹,转印后 TBST 洗膜 1 次。用含 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,取出膜后,TBS 洗膜,加入 Foxp3 一抗(1:400),4 °C 过夜。次日,TBST 洗膜 3 次后,加入二抗(1:2 000),室温下摇床振荡 1 h,TBST 清洗 4 次。酶显法显色。采用 FlourChem V 2.0 凝胶成像分析软件分析,记录每条蛋白电泳带的灰度值,进行定量分析。

**2.4 统计学处理** 数据全部输入 Excell 工作表中,计量资料结果应用 SPSS 13.0 软件处理,以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组比较用单因素方差分析,采用 Tukey 方法,率的比较用 Pearson 卡方检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**3 结果**

**3.1 各组小鼠甲状腺功能测定** NOD. H-2<sup>h4</sup> 小鼠各组间血清 TT<sub>3</sub>, TT<sub>4</sub> 及血清 TSH 比较未见明显统计学差异。

**3.2 甲状腺形态学改变** 如图 1 所示,模型组甲状腺炎症细胞浸润呈弥漫性改变,约占总面积 40% ~ 50% 左右;ZY1 淋巴细胞浸润明显呈小灶状改变;ZY3 组淋巴细胞浸润呈小片状改变。各组小鼠甲状腺炎的发生率比较见表 2。



A. 正常组; B. 模型组; C. 芪蛭消癭汤 20.8 g  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> 组; D. 芪蛭消癭汤 62.4 g  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> 组 (图 2 ~ 4 同)

图 1 芪蛭消癭汤对自身免疫甲状腺炎小鼠甲状腺形态学的影响(HE 染色,  $\times 400$ )

**3.3 甲状腺 IL-4, INF- $\gamma$  蛋白表达** 模型组 IL-4, INF- $\gamma$  呈低表达,多在甲状腺浸润淋巴细胞胞膜表达,ZY1,ZY3 组 IL-4, INF- $\gamma$  的表达较模型组增加见图 2 ~ 3,表 3。

表 2 芪蛭消瘦汤对自身免疫甲状腺炎小鼠  
甲状腺炎发生率的影响 ( $n = 10$ )

组别	给药剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	发生率
正常	-	0/10
模型	-	10/10 <sup>1)</sup>
芪蛭消瘦汤	20.8	1/10 <sup>2)</sup>
	62.4	3/10 <sup>2)</sup>

注:各组间  $X^2 = 26.813, P = 0.000$ ; 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

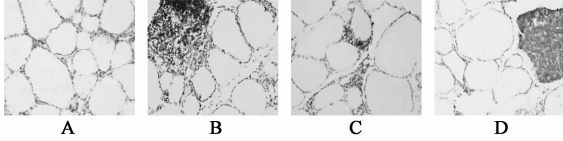


图 2 芪蛭消瘦汤对自身免疫甲状腺炎小鼠甲状腺组织  
IL-4 表达的影响(免疫组化染色,  $\times 400$  倍)

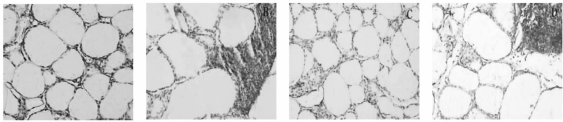


图 3 芪蛭消瘦汤对自身免疫甲状腺炎小鼠甲状腺组织  
INF- $\gamma$  表达的影响(免疫组化染色,  $\times 400$  倍)

表 3 芪蛭消瘦汤对自身免疫甲状腺炎小鼠甲状腺 IL-4,  
INF- $\gamma$  整合吸光度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	给药剂量 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	整合吸光度	
		IL-4	INF- $\gamma$
正常	-	0.21 $\pm$ 0.03	0.23 $\pm$ 0.03
模型	-	0.10 $\pm$ 0.02 <sup>1)</sup>	0.11 $\pm$ 0.03 <sup>1)</sup>
芪蛭消瘦汤	20.8	0.19 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>	0.20 $\pm$ 0.03 <sup>2)</sup>
	62.4	0.15 $\pm$ 0.02 <sup>3,4)</sup>	0.15 $\pm$ 0.02 <sup>3,4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ; 与芪蛭消瘦汤 20.8  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>5)</sup>  $P < 0.01$  (表 4 ~ 5 同)。

3.4 甲状腺 IL-4, INF- $\gamma$  mRNA 表达 模型组 IL-4, INF- $\gamma$  mRNA 呈低表达; ZY1, ZY3 组 IL-4, INF- $\gamma$  mRNA 表达显著上升。见表 4。

表 4 芪蛭消瘦汤对自身免疫甲状腺炎小鼠甲状腺 IL-4,  
INF- $\gamma$  mRNA 相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	给药剂量 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	mRNA 相对表达量	
		IL-4 mRNA	INF- $\gamma$ mRNA
正常	-	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.10
模型	-	0.28 $\pm$ 0.09 <sup>1)</sup>	0.17 $\pm$ 0.02 <sup>1)</sup>
芪蛭消瘦汤	20.8	0.73 $\pm$ 0.19 <sup>2)</sup>	0.63 $\pm$ 0.09 <sup>2)</sup>
	62.4	0.52 $\pm$ 0.08 <sup>2,5)</sup>	0.41 $\pm$ 0.06 <sup>2,5)</sup>

3.5 小鼠甲状腺 Foxp3 蛋白表达检测 如图 4 所示,在蛋白质相对分子质量为 48 kD, 43 kD 处有表达条带,分别是 Foxp3 和  $\beta$ -actin 蛋白表达。与正常组比较,模型组 Foxp3 相对表达量显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较,芪蛭消瘦汤显著提高 Foxp3 表达 ( $P < 0.01$ ),见表 5。

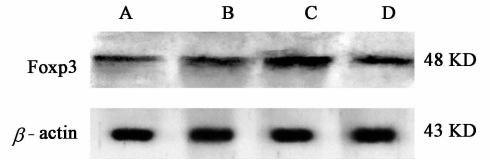


图 4 芪蛭消瘦汤对自身免疫甲状腺炎小鼠  
甲状腺 Foxp3 蛋白表达的影响

表 5 芪蛭消瘦汤对自身免疫甲状腺炎小鼠甲状腺  
Foxp3 蛋白相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	给药剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	Foxp3/ $\beta$ -actin
正常	-	1.65 $\pm$ 0.24
模型	-	0.52 $\pm$ 0.08 <sup>1)</sup>
芪蛭消瘦汤	20.8	1.33 $\pm$ 0.07 <sup>2)</sup>
	62.4	1.01 $\pm$ 0.13 <sup>2,5)</sup>

#### 4 讨论

Th1 介导细胞免疫,而 Th2 介导体液免疫<sup>[5]</sup>, IFN- $\gamma$  和 IL-4 分别为 Th1 和 Th2 细胞分泌的主要效应性细胞因子。有资料显示 IL-4 和 IFN- $\gamma$  可以抑制 Th17 细胞的分化<sup>[6]</sup>,缺少 IFN- $\gamma$  和/或 IL-4 下游信号分子的 CD4<sup>+</sup> T 细胞均能大量分泌 IL-17; IFN- $\gamma$  的高表达明显抑制 Th17 细胞分化<sup>[7-8]</sup>。可见,IFN- $\gamma$ , IL-4 抑制 Th17 细胞的分化, Th1, Th2 可以在一定程度上调节 Th17 的发育。

Foxp3 是 Treg 细胞特异性的转录因子,能够抑制免疫系统激活,预防过度的炎症反应和(或)自身免疫<sup>[9]</sup>,在机体免疫系统中发挥负向调节作用。近年来 Treg 细胞及 Treg/Th17 细胞轴在 AIT 中的作用日益引起人们的关注。Treg 细胞与 Th17 细胞关系密切,其分化过程均需要 TGF- $\beta$  的参与,在 TGF- $\beta$  单独作用下初始 T 细胞分化为 Treg 细胞,发挥免疫抑制作用;然而,当炎症介质 IL-6 存在时,初始 T 细胞分化为 Th17 细胞,促进炎症反应<sup>[10]</sup>,且可促进初始 T 淋巴细胞由分化为 Treg 细胞转向为分化为 Th17 细胞<sup>[11]</sup>。Chaudhry 等人<sup>[12]</sup> 的研究发现, Treg 细胞可以通过 STAT3 途径来抑制致病性的 Th17 细胞反应。Treg 细胞表达的转录因子 Foxp3 通过直接与 ROR $\gamma$ t 结合而抑制 ROR $\gamma$ t 介导 IL-17 mRNA 的

转录,从而影响 Th17 细胞的功能<sup>[13]</sup>。可见,Treg 和 Th17 的分化是相互抑制且功能呈负性调节,Th1/Th2/Treg/Th17 细胞亚群的分化过程之间存在微妙的调节关系,是相互影响、相互制约的关系。

笔者前期研究显示:NOD. H-2<sup>h4</sup>小鼠发生 AIT 可能与参与 Th17 细胞分化和调控的 IL-6,TGF- $\beta$ ,IL-17,IL-23,STAT3,ROR $\gamma$ t,RORa 的高表达有关,且芪蛭消癭汤治疗 AIT 的机制可能与其抑制 Th17 细胞分化相关。那么,NOD. H-2<sup>h4</sup>小鼠发生 AIT 是否与 Th1,Th2,Treg 细胞与 Th17 细胞之间的相互调节作用相关,芪蛭消癭汤对 NOD. H-2<sup>h4</sup>小鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群的影响是本研究的重点。

根据临床表现,自身免疫甲状腺炎可归属中医“癭病”范畴,属虚实夹杂之证。基于长期临床研究,高天舒教授发现本病与脾气虚弱相关,脾虚则痰浊内生,痰阻气滞,气滞血瘀,痰瘀互结,发为本病。提出“脾虚痰瘀”的病机特点,确立“健脾益气、化痰活血”的治疗大法,在补中益气汤的基础上,自拟中药复方芪蛭消癭汤治疗本病。取红参、黄芪为君药以益气;法半夏、浙贝母、生牡蛎、鳖甲为臣药以化痰、软坚散结;佐以当归、莪术以活血化瘀,诸药合用,共奏益气化痰活血之功。

笔者研究发现模型组 NOD. H-2<sup>h4</sup>小鼠甲状腺组织中 IFN- $\gamma$ ,IL-4,Foxp3 表达减少,说明 Th1,Th2,Treg 细胞可能对 Th17 细胞分化的抑制作用减弱,或是炎症环境促进了 Treg 细胞向 Th17 细胞的转变,从而促成 AIT 的发生。经芪蛭消癭汤治疗可以明显上调 IFN- $\gamma$ ,IL-4,Foxp3 的表达,从而增强对 Th17 细胞的分化的抑制,减少 IL-17 的产生,减轻 AIT 的程度,发挥免疫抑制作用。因此芪蛭消癭汤可能通过增强 Th1,Th2,Treg 对 Th17 细胞分化的抑制而起到治疗作用。但不同 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群调节分化存在着错综复杂的关系,与之相关的细胞因子网络关系亦尚未完全明确,所以仍需要通过更多的科学论证去证实 Th1,Th2,Th17,Treg 细胞间的相互关系,寻找调节不同 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群平衡的关键细胞因子作为靶点,研究中药治疗的具体机制,将为 AIT 的防治提供全新的视野。

#### [参考文献]

[1] Pearce E N, Farwell A P, Braverman L E. Thyroiditis

[J]. N Engl J Med,2003,348(26):2646.

[2] 王英娜,高天舒.从脾虚痰瘀论治桥本甲状腺炎 30 例疗效观察[J].新中医,2008,40(12):52.

[3] Rose N R, Bonita R, Burek C L. Iodine: an environmental trigger of thyroiditis [J]. Autoimmunity Reviews,2002,1(1/2):97.

[4] Bagchi N, Brown T R, Sundick R S. Thyroid cell injury is an initial event in the induction of autoimmune thyroiditis by iodine in obese strain chickens [J]. Endocrinology,1995,136(11):5054.

[5] 徐寒松,孔德明,向慧.中药泻火养阴散对 Graves' 病患者 Th1/Th2 细胞因子平衡的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(10):231.

[6] Park H, Li Z, Yang X O, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin17[J]. Nat Immunol,2005,6(11):1133.

[7] O' Cormor W Jr, Kamanaka M, Booth C J, et al. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation [J]. Nat Immunol, 2009, 10(6):603.

[8] Awasthi A, Kuehroo V K. IL-17A directly inhibits Th1 cells and thereby suppresses development of intestinal inflammation[J]. Nat Immunol,2009,10(6):568.

[9] 贲莹,王秀丽,张风华,等.黄连温胆汤加减方对大鼠自身免疫性神经炎的作用[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(9):237.

[10] Zhou L, LoPes J E, Chong M M, et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR gamma function [J]. Nature, 2008, 453(7192):236.

[11] Saito S, Nakashima A, Shima T, et al. Th1/Th2/Th17 and regulatory T cell paradigm in pregnancy [J]. Am J Reprod Immunol,2010,63(6):601.

[12] A Chaudhry, D Rudra, P Treuting, et al. CD4<sup>+</sup> regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner [J]. Science,2009,326(5955):986.

[13] Ichiyama K, Yoshida H, Wakabayashi Y, et al. Foxp3 inhibits ROR gamma t mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with ROR gamma t [J]. Biol Chem,2008,283(25):17003.

[14] 刘妍,张平,李明,等.补肾方对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠 T 辅助细胞 1,17 和调节性 T 细胞的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(3):116.

[责任编辑 聂淑琴]