DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.11.019

补中益气汤通过 Notch1/ROR－γt/Foxp3 信号通路控制 Th17/Treg 免疫失衡调控 AIT 炎症损伤的机制

王金曦[1],田晓君[2],高天舒[3]
(1.辽宁中医药大学,辽宁 沈阳 110847;2.沈阳市第二中医医院,辽宁 沈阳 110101;
3.辽宁中医药大学附属医院,辽宁 沈阳 110032)

摘要:目的 探讨补中益气汤对自身免疫性甲状腺炎(Autoimmune thyroiditis,AIT)小鼠辅助性T细胞17(T helper cell 17,Th17)/调节性T细胞(Regulatory T cells,Treg)免疫失衡及果蝇双翅边缘缺刻同源基因1(Notch1)/维甲酸相关孤核受体γt(ROR－γt)/叉头样转录因子3(Foxp3)信号通路的影响。方法 80只CBA/J小鼠分为空白组15只、模型组65只,用PBS缓冲液+不完全弗氏佐剂(Freund's incomplete adjuvant,IFA)建立AIT模型。造模成功的小鼠随机分为模型组、补中益气汤低、中、高剂量组(4.10、8.19、16.38 g·kg^{-1})及西药组(亚硒酸钠片,0.26 mg·kg^{-1}),每组11只。空白组、模型组予等剂量生理盐水灌胃,灌胃1次/d,每灌胃6 d,停止1 d,持续6周。苏木素－伊红(Hematoxylin－eosin,HE)染色及扫描电子显微镜(Scanning electron microscope,SEM)观察甲状腺形态学改变;酶联免疫吸附测定法(Enzyme－linked immunosorbent assay,ELISA)检测血清甲状腺球蛋白抗体(TgAb)、促甲状腺激素(TSH)、游离甲状腺激素(FT4)含量及白细胞介素(IL)－10、IL－17A、IL－23;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real－Time PCR)检测甲状腺组织Notch1、Foxp3、ROR－γt mRNA表达;蛋白免疫印迹法(Western blot,WB)检测甲状腺组织Notch1、Foxp3、ROR－γt蛋白水平。结果 与空白组比,模型组小鼠血清TgAb、IL－17A、IL－23含量显著升高,血清IL－10水平明显降低($P<0.01$),HE见模型组小鼠甲状腺滤泡结构被破坏,淋巴细胞大片状浸润,SEM见下大量密集细长的微绒毛。与模型组比,给药组血清TgAb水平均有下降,以补中益气汤中、高剂量组及西药组小鼠的变化为显著($P<0.01$)。补中益气汤低剂量组小鼠血清IL－17A、IL－23水平降低,血清IL－10水平升高($P<0.05$);补中益气汤中、高剂量组及西药组小鼠血清IL－17A、IL－23水平明显降低,IL－10水平明显升高($P<0.01$),各给药组小鼠滤泡上皮细胞破坏程度较轻,淋巴细胞浸润等情况均有所改善,SEM见细胞表面微绒毛均明显减少。与空白组比,模型组小鼠甲状腺组织Notch1、ROR－γt mRNA及蛋白表达水平明显升高,Foxp3 mRNA及蛋白表达水平显著降低($P<0.01$);与模型组比,补中益气汤组ROR－γt、Notch1 mRNA及蛋白表达水平均有不同程度降低,Foxp3 mRNA及蛋白表达水平均有不同程度升高,以补中益气汤高剂量最为显著($P<0.01$)。结论 补中益气汤可以明显修复AIT小鼠甲状腺组织病理改变,缓解炎性损伤,主要是通过调控Notch1/ROR－γt/Foxp3信号通路,平衡免疫反应,建立免疫机能,实现治疗AIT。

关键词:自身免疫性甲状腺炎;果蝇双翅边缘缺刻同源基因1/维甲酸相关孤核受体γt/叉头样转录因子3(Notch1/ROR－γt/Foxp3)信号通路;辅助性T细胞17(Th17)/调节性T细胞(Treg);补中益气汤
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)11-0084-08

Buzhong Yiqi Decoction(补中益气汤)Regulates Immune Imbalance of Th17/Treg through Notch1/ROR－γt/Foxp3 Signaling Pathway to Regulate Inflammatory Injury of AIT

WANG Jinxi[1],TIAN Xiaojun[2],GAO Tianshu[3]
(1.Liaoning University of Chinese Medicine,Shenyang 110847,Liaoning,China;
2.Shenyang Second Hospital of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110101,Liaoning,China;
3.Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110032,Liaoning,China)

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82174359)
作者简介:王金曦(1992－),女,辽宁沈阳人,实验师,博士在读,研究方向:中医药防治甲状腺及代谢性疾病。
通讯作者:高天舒(1967－),男,辽宁铁岭人,主任医师,博士研究生导师,博士,研究方向:中医药防治内分泌代谢性疾病。E-mail:gaotianshu67@163.com。

Abstract: *Objective* To investigate the effects of Buzhong Yiqi Decoction (补中益气汤) on the immune imbalance of T helper cell 17 (Th17)/regulatory T cell (Treg) and the Notch1/ROR－γt/Foxp3 signaling pathway in mice with autoimmune thyroiditis (AIT). *Methods* Eighty CBA/J mice were randomly divided into normal group (15 mice) and model group (65 mice). PBS + Freund's incomplete adjuvant (IFA) was used to establish the AIT model. The mice were randomly divided into model group, Buzhong Yiqi Decoction low－dose, medium－dose and high－dose groups (4.10, 8.19, 16.38 g·kg^{-1}) and western medicine group (sodium selenite tablets, 0.26 mg·kg^{-1}), 11 mice in each group. The mice in the normal group and the model group were given the same dose of normal saline by gavage once a day, every 6 days, and stopped for 1 day, for 6 weeks. Hematoxylin－eosin (HE) staining and scanning electron microscopy (SEM) were used to observe the morphological changes of thyroid. The serum levels of thyroglobulin antibody (TgAb), thyroid stimulating hormone (TSH), free thyroid hormone (FT4), interleukin (IL)－10, IL－17A and IL－23 were detected by enzyme－linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expressions of Notch1, Foxp3 and ROR－γt in thyroid tissues were detected by Real－Time PCR. Western blot (WB) was used to detect the protein levels of Notch1, Foxp3 and ROR－γt in thyroid tissue. *Results* Compared with those in the normal group, the serum levels of TgAb, IL－17A and IL－23 in the model group were significantly increased, while the serum level of IL－10 was significantly decreased ($P<0.01$). HE staining showed that the structure of thyroid follicles in the model group was destroyed, lymphocytes were infiltrated in large sheets, and a large number of dense and slender microvilli were observed under SEM. Compared with that in the model group, the serum level of TgAb in the drug treatment groups decreased, and the changes in the Buzhong Yiqi Decoction middle－dose and high－dose groups and the western medicine group were more significant ($P<0.01$). The serum levels of IL－17A and IL－23 of Buzhong Yiqi Decoction low－dose group were decreased, and the serum levels of IL－10 elevated ($P<0.05$). The serum levels of IL－17A and IL－23 were significantly decreased, and the serum level of IL－10 was significantly increased in the Buzhong Yiqi Decoction medium－dose and high－dose groups and the western medicine group ($P<0.01$). The degree of destruction of follicular epithelial cells was mild, lymphocyte infiltration was improved, and the microvilli on the cell surface was significantly reduced in each treatment group. Compared with those of the normal group, the expression levels of Notch1 and ROR－γt mRNA and protein in the thyroid tissue of the model group were significantly increased, and the expression levels of Foxp3 mRNA and protein were significantly decreased ($P<0.01$). Compared with those in the model group, the expression levels of ROR－γt and Notch1 mRNA and protein in the Buzhong Yiqi Decoction groups were decreased to varying degrees, and the expression levels of Foxp3 mRNA and protein were increased to varying degrees, and those in the Buzhong Yiqi Decoction high－dose group was the most significant ($P<0.01$). *Conclusion* Buzhong Yiqi Decoction can significantly repair the pathological changes of thyroid tissue and alleviate inflammatory damage in AIT mice, mainly by regulating the Notch1/ROR－γt/Foxp3 signaling pathway to balance the immune response and establish immune function.

Keywords: autoimmune thyroiditis; Notch1/ROR－γt/Foxp3; Th17/Treg; Buzhong Yiqi Decoction (补中益气汤)

自身免疫性甲状腺炎(Autoimmune thyroiditis, AIT)是以甲状腺内淋巴细胞浸润和血清中存在甲状腺特异性自身抗体为特征的最常见的“破坏性”器官特异性自身免疫性疾病之一。最新研究调查显示,中国人群AIT患病率为14.19%,甲状腺过氧化物酶抗体(TPO－Ab)和甲状腺球蛋白抗体(TgAb)阳性率分别为10.19%和9.7%[1]。AIT的发病涉及遗传、环境和免疫因素的复杂交互作用,其发病机制相当复杂,而目前确切的病因还未完全明确。对于AIT,目前尚无很好的病因治疗方法[2],仅限于对症治疗,常用药物包括硒制剂及维生素D等。

AIT在中医学中属“瘿病”范畴。现代医家针对AIT的中医病因病机、辨证分型提出不同的治疗方案[3－5]。现代研究表明,辅助性T细胞17(T helper cell 17, Th17)通过产生高水平的白细胞介素(IL)－17在自身免疫和炎症反应的发病和发展中起着至关重要的作用。课题组前期研究及多项报道均证实[6－7],Th17/调节性T细胞(Regulatory T cells, Treg)免疫失衡是AIT发病的重要免疫学机制。补中益气汤出自金元四大家李东垣之《脾胃论》,由黄芪、白术、甘草、人参、陈皮、升麻、柴胡、当归共8味药组成。现代研究表明健脾补气升阳之补中益气汤在改善AIT早期免疫异常等方面具有特色优势作用[8－9]。本团队前期研究发现,中医“补气健脾”法具有良好的疗效,补中益气汤加减干预AIT进程具有显著疗效[10],可有效改善AIT免疫失常状态。

近年来越来越多的研究证明,果蝇双翅边缘缺刻同源基因1(Notch1)信号通路通过调节细胞发育、增殖、分化等在类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、银屑病、自身免疫性脑脊髓炎等自身免疫性疾病中发挥重要作用[11],可能通过调控Th17细胞分化及功能、调节Th17/Treg免疫失衡实现。而Th17/Treg免疫失衡已被证明在AIT中广泛存在[12－13],这些都提示Notch1通路可能是AIT的有效干预靶点。维甲酸相关孤核受体γt(ROR－γt)可以调节Th17细胞特异性转录[14],而Treg细胞以转录因子Foxp3的高表达为特征[15]。因此,本实验拟在前期研究基础上,探讨补中益气汤对Th17/Treg免疫失衡及Notch1/ROR－γt/Foxp3信号通路的调控作用,从免疫学角度进一步探析AIT的发病机制,为AIT的病因治疗提供新策略。

1 材料

1.1 动物及细胞

SPF 级 CBA/J 小鼠 80 只，体质量(20 ± 2)g，1 ~ 8 周龄，购于沈阳蓝普达斯实验用品科技有限公司，许可证编号：SCXK(京)2019 - 0008，于辽宁中医药大学 SPF 级实验动物中心饲养。所有动物的饲养及实验流程均按照辽宁中医药大学动物实验指南执行，伦理审查编号 21000042021128。

1.2 实验药品及制备

中药予补中益气汤干预，补中益气汤组成：黄芪 18 g(批号：2301142)，白术 9 g(批号：2302181)，甘草 9 g(批号：2301298)，人参 6 g(批号：2302086)，陈皮 6 g(批号：2209092)，升麻 6 g(批号：2212023)，柴胡 6 g(批号：2302157)，当归 3 g(批号：2303264)，中药饮片购自辽宁中医药大学附属医院草药局，药材鉴定由辽宁中医药大学附属医院高天舒教授完成。辽宁中医药大学附属医院药房煎煮，方法如下：原药材加 5 倍量双蒸水煎煮 2 次，合并滤液，加热浓缩配制成含生药浓度为 1.0 g · mL^{-1} 的药液。西药予亚硒酸钠片(商品名称：希力；规格：0.5 mg；批准文号：国药准字 H20073179；生产企业：山东希力药业有限公司)。

1.3 试剂

完全弗氏佐剂(Freund's complete adjuvant，CFA)、IFA(Sigma，货号 F5881、F5506)；猪甲状腺球蛋白(pTg)(Sigma - Aldrich，货号 T1126)；甲状腺球蛋白抗体 TgAb 酶联免疫检测试剂盒(武汉菲恩生物科技有限公司，EM1420)；PBS(普诺赛，货号 PB180327)；小鼠抗甲状腺球蛋白抗体(TgAb)、促甲状腺激素(TSH)、游离甲状腺激素(FT4)、IL - 10、IL - 17A、IL - 23 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司，货号 ml037680、ml063200、ml057763、ml037873、ml037864、ml063140)；苏木素 - 伊红(HE)染色试剂盒(佳维斯，货号 JA1051)；BCA 蛋白定量检测试剂盒(Solarbio，货号 R0020)；HRP 标记山羊抗兔(Solarbio，货号 SE134)；HRP 标记山羊抗鼠(Servicebio，货号 GB23301)；Notch1、Foxp3、ROR - γt 一抗(proteintech，货号 10062 - 2 - AP、82930 - 1 - RR、22228 - 1 - AP)；Trizol 试剂(赛默飞，货号 15596026)；M - MLV 反转录试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司，货号 231219Q)。

1.4 仪器

荧光显微镜(Olympus 公司)、扫描电子显微镜(Hitachi，SU3500)、实时荧光定量 PCR 仪(Thermo Fisher，Q3)、Quant Studio3 型 PCR 扩增仪(ABI 公司)、Tanon - 5200 型显影仪(Tanon 公司)、酶标仪(BioTek，elx80)、研磨仪(Servicebio，KZ - Ⅱ)、台式高速冷冻离心机(Cence，TGL - 16)、电泳仪(Servicebio，SPW - 6S)。

2 方法

2.1 实验动物造模及治疗

CBA/J 小鼠根据体质量层次随机分组，分为空白组(15 只)、模型组(65 只)。将 pTg 用 PBS 缓冲液溶解后与等量 CFA 混合充分乳化成油包水乳剂，终浓度为 0.25 mg · mL^{-1}。第 1、2 周进行初次免疫造模：模型组皮下多点注射 pTg 乳剂，空白组则仅注射 PBS + CFA，1 次/周；第 4、5 周进行强化免疫：模型组给予等浓度 pTg(PBS 溶解) + IFA 皮下多点注射，空白组予以皮下多点注射等浓度 PBS + IFA，1 次/周。注射剂量均为每只 0.8 mL/次，即每只 200 μg/次。第 6 周随机抽取空白组和模型组小鼠各 4 只进行 AIT 模型判断：以甲状腺腺体中淋巴细胞的浸润面积大于 2%，血清 TgAb 水平高于空白组即为模型成功[16 - 17]。

造模成功后，剩余空白组小鼠 11 只，模型组小鼠 61 只，在造模成功的 61 只模型组小鼠中随机抽取 55 只继续实验。将造模成功的小鼠 55 只随机分为模型组、补中益气汤低剂量组、中剂量组、高剂量组及西药组，每组 11 只，灌胃给药干预。其中，补中益气汤低、中、高剂量组分别给与补中益气汤 4.10、8.19、16.38 g · kg^{-1} · d^{-1} 灌胃，西药对照组予亚硒酸钠溶液 0.26 mg · kg^{-1} · d^{-1} 灌胃，空白组、模型组予等剂量生理盐水灌胃，灌胃 1 次/d，每灌胃 6 d，停止 1 d，药物干预持续 6 周。在药物治疗过程中，各组动物依然按照强化免疫造模的分组及干预方式持续进行造模。第 12 周灌胃结束后，各组小鼠禁食不禁水 24 h，处死所有动物，摘眼球取血，离心留取血清分装保存，甲状腺组织取材固定。

2.2 病理实验

2.2.1 HE 染色检测小鼠甲状腺组织病理变化 取各组小鼠甲状腺组织取材固定后，脱水，包埋，切成约 5 μm 切片；HE 染色，中性树胶封片，加盖玻片，晾干，制成 HE 切片，400 倍光镜下每张 HE 染色切片随机取 5 个视野，观察甲状腺组织病理变化。

2.2.2 扫描电镜观察小鼠甲状腺组织病理变化 小鼠甲状腺组织经生理盐水清洗冲洗后，用戊二醛及锇酸双固定，采用乙醇溶液进行样品脱水，再用体积比为 1∶1 的乙醇与醋酸异戊酯混合液及纯醋酸异戊酯处理样品。临界点干燥后放入离子镀膜机，镀喷一层金离子导电层，采用扫描电镜观察拍照。

2.3 ELISA 检测小鼠血清 TgAb、TSH、FT4、IL - 10、IL - 17A、IL - 23 水平

收集处理各组小鼠血清，按 ELISA 试剂盒说明书方法检测血清 TgAb、TSH、FT4、IL - 10、IL - 17A、IL - 23 含量。

2.4 Real - Time PCR 法检测小鼠甲状腺 Notch1、ROR - γt、Foxp3 基因相对表达量

Trizol 法提取总 RNA，合成 cDNA。依试剂盒，制备 PCR 反应体系，常规 PCR 扩增。以 GAPDH 作为内参，目的基因 Notch1、ROR - γt 和 Foxp3 的相对表达量按照 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 公式计算表示。上述涉及到的基因引物序列如表 1 所示。

表 1 涉及到的基因引物序列设计

引物	序列(5′-3′)	长度/(bp)
Notch1	上游 TCATTGTACTGGAACTCTGCACTTT	80
	下游 TCCACGGTCACCCTTCTCA	
ROR - γt	上游 GTGGGGACAAGTCGTCTGG	238
	下游 AGTGCTGGCATCGGTTTCG	
Foxp3	上游 CCTGCCTTGGTACATTCGTG	97
	下游 TGTTGTGGGTGAGTGCTTTG	

2.5 Western blotting 法检测小鼠甲状腺组织中 Notch1、ROR－γt、Foxp3 蛋白表达

常规提取总蛋白，验证样本合格后，进行后续实验。定量、电泳后，转膜，5% 脱脂牛奶封闭 2 h，加入一抗 Foxp3、ROR－γt、Notch1，分别按照 1∶1000、1∶2000、1∶3000 稀释，4 ℃孵育过夜。漂洗后加入羊抗兔二抗（1∶5000 稀释）在常温下孵育 45 min，清洗。加入 ECL 试剂，可视显色，利用 Quantity One 软件对所得图像进行量化，以 Image J 软件计算获得条带的亮度。

2.6 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析，计量资料以（$\bar{x} \pm s$）表示。满足正态分布和方差齐性时，采用 One－way ANOVA 分析；满足正态分布但方差不齐，采用 Dunnett *T*3 检验，均使用 LSD－*t* 检验进行组间比较。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 补中益气汤对各组小鼠甲状腺组织形态的影响

HE 染色结果显示，空白组小鼠甲状腺组织光镜下甲状腺滤泡结构完整，形态规则，呈圆形或椭圆形，较为均匀一致，滤泡上皮细胞呈低柱状，排列整齐，滤泡腔可见充盈的淡红色胶质，滤泡间质内存在丰富的毛细血管，未见淋巴细胞浸润。模型组小鼠甲状腺滤泡大小及形态各异，滤泡结构被破坏，多呈萎缩状，胶质含量减少，间质内毛细血管数量及上皮细胞数量减少，呈现弥漫性大片状淋巴细胞浸润，浸润面积达 30% 以上。补中益气汤低、中、高剂量组及西药组小鼠甲状腺滤泡上皮细胞破坏程度较轻，滤泡腔萎缩、胶质减少及淋巴细胞浸润等情况均有所改善。见插页Ⅻ图 1。

扫描电镜结果显示，空白组甲状腺滤泡上皮细胞表面可见球状结构，无明显微绒毛。模型组小鼠表面可见大量密集细长的微绒毛。补中益气汤低、中、高剂量组及西药组甲状腺滤泡上皮细胞表面微绒毛均明显减少。见插页ⅩⅢ图 2。

3.2 补中益气汤对各组小鼠甲状腺功能、抗体及血清炎性细胞因子的影响

各组小鼠血清 FT4、TSH 水平差异无统计学意义（$P>0.05$）。与空白组相比，模型组小鼠血清 TgAb 水平明显升高（$P<0.01$）；与模型组相比，血清 TgAb 水平在各干预组均有下降，以补中益气汤中、高剂量组及西药组小鼠的变化为显著（$P<0.01$）。与空白组相比，模型组小鼠血清 IL－17A、IL－23 水平明显升高，而血清 IL－10 水平明显降低（$P<0.01$）；与模型组相比，补中益气汤低剂量组小鼠血清 IL－17A、IL－23 水平降低（$P<0.05$），血清 IL－10 水平升高（$P<0.05$）；补中益气汤中、高剂量组及西药组小鼠血清 IL－17A、IL－23 水平明显降低（$P<0.01$），血清 IL－10 水平明显升高（$P<0.01$）。见表 1。

3.3 补中益气汤对各组小鼠甲状腺组织中 Notch1、ROR－γt、Foxp3 mRNA 水平的影响

与空白组相比，模型组 Notch1、ROR－γt mRNA 表达水平明显升高，Foxp3 mRNA 表达水平显著降低（$P<0.01$）；与模型组相比，补中益气汤组 ROR－γt、Notch1 mRNA 表达水平均有不同程度降低，Foxp3 mRNA 表达水平均有不同程度升高（$P<0.01$），以补中益气汤高剂量组干预效果最为显著。西药组 ROR－γt、Notch1 mRNA 表达水平均有显著降低，Foxp3 mRNA 表达水平显著升高（$P<0.01$）。见表 2。

3.4 补中益气汤对各组小鼠甲状腺组织中 Notch1、ROR－γt、Foxp3 蛋白表达的影响

与空白组相比，模型组小鼠甲状腺组织 Notch1、ROR－γt 蛋白水平显著升高，Foxp3 蛋白显著降低（$P<0.01$）；与模型组相比，补中益气汤各剂量组及西药组小鼠甲状腺组织 Notch1、ROR－γt 蛋白水平均降低，补中益气汤低、中剂量 Notch1、ROR－γt 蛋白水平下降（$P<0.05$），Foxp3 蛋白升高（$P<0.05$），补中益气汤高剂量及西药组 Notch1、ROR－γt 蛋白水平显著下降（$P<0.01$），Foxp3 蛋白显著升高（$P<0.01$）。见图 3、表 3。

4 讨论

AIT 是一种常见的自身免疫性疾病，其特征是甲状腺炎症和抗甲状腺抗体呈高滴度水平[18－19]。在中医学中属“瘿病”范畴。“脾为之卫”理论认为，脾胃助生卫气，卫气御外防护，形成人体屏障，即脾行卫之功，成为最早的中医免疫学原理。《难经》记载“脾者，中州也，其平和不可得见，衰乃见耳”，揭示了脾与免疫之间的密切关系。脾胃运化水谷精微，为后天免疫系统奠定基础，若脾虚运化失司，则卫气亏虚，正气不足，外邪来犯，“脾失之卫”而致病。“脾失之卫”作为 AIT 中医理论切入点，治疗上应从后天之本“脾”入手，以“补脾益气”为治疗方法，使“正胜邪自去”，以恢复人体自身正气，达到“益气消瘿”之功效。选方补中益气汤，首载于《内外伤辨惑论·卷中·饮食劳倦论》，该方根据《素问·至真要大论篇》“劳者温之”“损者益之”的治疗原则，为饮食劳倦，损伤脾胃，以致脾胃气虚清阳不升之证所设。团队前期研究发现，补脾益气之补中益气汤

表 1 补中益气汤对 AIT 小鼠 FT4、TSH、TgAb、IL－17A、IL－23、IL－10 的影响（$\bar{x} \pm s$）

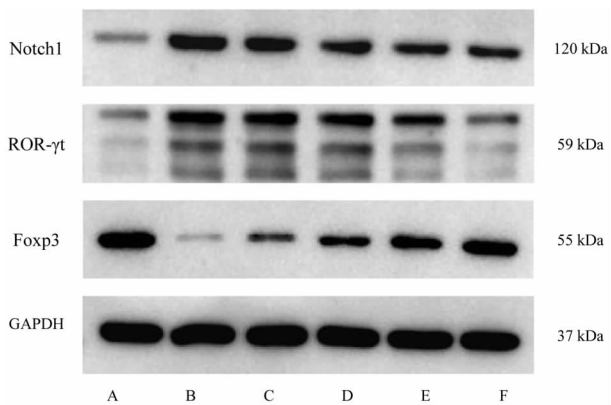
组别	*n*	剂量/（g·kg^{-1}）	FT4/（nmol·L^{-1}）	TSH/（mIU·L^{-1}）	TgAb/（ng·mL^{-1}）	IL－17A/（ng·L^{-1}）	IL－23/（ng·L^{-1}）	IL－10/（ng·L^{-1}）
空白组	11		79.62±11.41	0.31±0.029	14.65±1.79	2.1±0.98	12.51±0.77	3.37±0.12
模型组	11		80.44±15.53	0.30±0.024	31.94±5.81*	6.77±0.05*	20.21±1.43*	6.17±0.06*
补中益气汤低剂量组	11	4.10	80.07±13.05	0.31±0.015	28.89±3.38*△	5.43±0.12*△	16.91±3.35*△	3.49±1.11*△
补中益气汤中剂量组	11	8.19	79.52±12.96	0.31±0.044	25.64±4.96*#	4.89±1.21*#	16.67±2.46*#	4.56±2.07*#
补中益气汤高剂量组	11	16.38	81.28±15.88	0.29±0.021	18.72±4.75*#	3.07±0.33*#	15.34±1.29*#	5.12±1.81*#
西药组	11	0.26×10^{-3}	80.74±12.28	0.30±0.012	16.46±3.49*#	2.66±0.07*#	13.66±0.07*#	5.09±2.37*#

注：* 与空白组小鼠相比较，$P<0.01$；# 与模型组小鼠相比较，$P<0.01$；△ 与模型组小鼠相比较，$P<0.05$。

表 2 补中益气汤对 AIT 小鼠甲状腺组织 Notch1、ROR－γt、Foxp3 mRNA 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/($g \cdot kg^{-1}$)	Notch1 mRNA	ROR－γt mRNA	Foxp3 mRNA
空白组	11		1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
模型组	11		3.869±0.430**	2.372±0.081**	0.198±0.029**
补中益气汤低剂量组	11	4.10	3.108±0.485##	1.896±0.244##	0.348±0.062##
补中益气汤中剂量组	11	8.19	2.357±0.438##	1.512±0.249##	0.575±0.056##
补中益气汤高剂量组	11	16.38	1.543±0.514##	1.078±0.100##	0.830±0.065##
西药组	11	0.26×10^{-3}	1.152±0.203##	1.035±0.133##	0.911±0.054##

注：**与空白组小鼠相比较，$P<0.01$；##与模型组小鼠相比较，$P<0.01$。



注：A 空白组；B 模型组；C 补中益气汤低剂量组；D 补中益气汤中剂量组；E 补中益气汤高剂量组；F 西药组。

图 3 补中益气汤对 AIT 小鼠甲状腺组织 Notch1、ROR－γt、Foxp3 蛋白表达的影响

表 3 补中益气汤对 AIT 小鼠甲状腺组织 Notch1、ROR－γt、Foxp3 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/($g \cdot kg^{-1}$)	Notch1 mRNA	ROR－γt mRNA	Foxp3 mRNA
空白组	11		0.33±0.03	0.26±0.02	0.98±0.01
模型组	11		0.97±0.14**	0.98±0.04**	0.11±0.02**
补中益气汤低剂量组	11	4.10	0.72±0.06#	0.80±0.08#	0.29±0.11#
补中益气汤中剂量组	11	8.19	0.64±0.13#	0.74±0.10#	0.50±0.14#
补中益气汤高剂量组	11	16.38	0.52±0.06##	0.59±0.12##	0.63±0.12##
西药组	11	0.26×10^{-3}	0.46±0.12##	0.35±0.03##	0.75±0.08##

注：**与空白组小鼠相比较，$P<0.01$；#与模型组小鼠相比较，$P<0.05$；##与模型组小鼠相比较，$P<0.01$。

在改善 AIT 早期免疫异常等方面具有特色优势作用[8]，中医补脾益气法具有良好的疗效，临床上补中益气汤加减干预 AIT 进程具有显著疗效[7]，可有效改善 AIT 免疫失常状态。

本研究在团队前期研究基础上，构建 AIT 动物模型并进行中药干预。实验结果显示，各组小鼠血清 FT4、TSH 基线水平基本一致，表明本实验造 AIT 模型成功。模型组小鼠血清 TgAb 水平明显升高，这表明当甲状腺组织发生炎性反应后，免疫系统被激活，释放抗体，引起血清 TgAb 水平升高。经补中益气汤干预后，各组小鼠血清 TgAb 水平呈不同程度地降低，以补中益气汤高剂量组效果突出。考虑是由于补中益气汤补脾益气之功效能够化痰散瘀，消瘿散结，从而改善甲状腺炎性反应，修复受损的滤泡，调节免疫等。这与楼鹏飞等[20]的研究结果相符合。模型组小鼠 HE 可见甲状腺组织腺滤泡大小及形态各异，滤泡结构被破坏，多呈萎缩状，细胞呈现弥漫性大片状淋巴细胞浸润，面积达 30% 以上；SEM 显示，模型组小鼠的甲状腺表面有大量密集细长的微绒毛，提示 TSH 刺激的胞吞作用活跃，细胞表面代谢面积增大。经补中益气汤干预后 HE 可见甲状腺滤泡上皮细胞破坏程度较轻，滤泡腔萎缩、胶质减少及淋巴细胞浸润等情况均有所改善，均以补中益气汤高剂量组显著；甲状腺滤泡上皮细胞表面微绒毛均明显减少，提示经药物干预后，TSH 刺激的胞吞作用减弱，细胞表面代谢面积减小。上述结果证明了补中益气汤治疗 AIT 的疗效确切，与团队前期研究结果具有一致性[7,21]。

虽然现今为止 AIT 的发病机制仍不明确，但研究表明，Treg 细胞和 Th17 细胞的功能失衡在 AIT 的发病机制中起着重要作用[22]。Th17 和 Treg 的异常频率和功能与甲状腺自身免疫的严重程度密切相关[23]。课题组前期研究证实，补中益气汤可下调 EAT 小鼠 Th17/Treg 轴相关细胞因子，恢复 Th17/Treg 免疫平衡[24]。

Th17 细胞特有的转录因子 ROR－γt，主要表达于免疫系统的一些不同类型细胞，促进 Th17 细胞分化并产生关键因子 IL－17，是 Th17 细胞分化必不可少的转录因子，直接诱导炎症因子的转录。ROR－γt 结合于 IL－17 基因启动子区域，诱导 IL－17A 的产生从而发挥相应的效应。最近的证据表明 ROR－γt 可以在不涉及任何其他因素的情况下，显著上调 IL－17。IL－23 参与幼稚 $CD4^+$ T 细胞诱导 Th17 细胞发育过程，还可扩大 Th17 细胞群并维持其存活[25]。IL－23 通过与 IL－23 受体结合激活信号传导转录激活因子 3(STAT3)，促进炎症因子、细胞因子和趋化因子的分泌，诱导记忆 T 细胞分化为 Th17 细胞，并通过增加 ROR－γt 的表达影响 IL－17 的表达，最终促进炎性反应和自身免疫性疾病的发生[26]。因此抑制 ROR－γt 可降低 Th17 细胞的分化，限制 Th17 细胞的分化与功能，从而起到治疗自身免疫性疾病的目的。

Treg 细胞高表达 Foxp3，在 Treg 细胞的分化发育及功能稳定维持中发挥着决定性作用的作用因子。$Foxp3^+$ treg 是一种特殊的细胞系，在维持免疫耐受方面起着重要作用[27]。ROR－γt 与 Foxp3 作为各种转录因子的转录抑制因子，Foxp3 通过 Foxp3 的外显子 2 区直接与 ROR－γt 相互作用。Treg 分泌的 IL－10 调节 Th17 细胞群的作用，对甲状腺的损伤起保护作用。

Notch 受体是一种跨膜蛋白，包括 4 种亚型，与细胞分化、细胞增殖、细胞凋亡和上皮－间质转化有关。近年来，研究表明 Notch1 和 ROR－γt 除了参与诱导细胞凋亡外，还参与调控机体炎症反应，与自身免疫性疾病的发生发展密切相关[28]。围绕基于 Notch1/ROR－γt 信号通路在 AIT 作用的研究也开展较多[28]。因此，我们推测炎症细胞因子 IL－10、IL－17A、IL－23 水平的变化是否与 Notch1/ROR－γt/Foxp3 失衡有关。实验结果发现，模型组小鼠经补中益气汤干预后，各组小鼠血清 IL－17A、IL－23 水平降低，这表明补中益气汤可能通过调节促炎细胞因子表达修复受损伤的甲状腺滤泡，改善甲状腺炎症

损伤状态；各组小鼠血清 IL－10 水平呈不同程度地升高，表明补中益气汤能够促进血清 IL－10 的产生，而达到抗炎的作用，治疗 AIT。这与团队前期其他中药复方的研究结果相一致[29]。经中药干预后，抑制 ROR－γt、Notch1 mRNA 及蛋白表达水平，上调 Foxp3 mRNA 及蛋白表达水平，以补中益气汤高剂量组干预效果最为显著，提示补中益气汤可以通过调控 Notch1/ROR－γt/Foxp3 减轻 AIT 小鼠免疫炎症。

综上所述，我们证实了补中益气汤可有效缓解 AIT 炎性损伤，修复甲状腺组织形态。其可能机制是通过 Notch1/ROR－γt/Foxp3 信号通路调节 Th17/Treg 平衡免疫反应，建立免疫机能，实现治疗 AIT 的目的。这对于今后 AIT 的临床治疗提供了新的防治途径，将为补中益气汤作为治疗 AIT 领域的有效临床用药提供理论支持。

参考文献

[1] SHAN Z Y, CHEN L L, LIAN X L, et al. Iodine status and prevalence of thyroid disorders after introduction of mandatory universal salt iodization for 16 years in China: a cross－sectional study in 10 cities [J]. Thyroid, 2016, 26(8): 1125－1130.

[2] 单忠艳，滕卫平. 自身免疫性甲状腺病防治的挑战和曙光[J]. 国际内分泌代谢杂志，2021，41(1)：1－4.

[3] 丁雷，董笑克，刘玮，等. 刘铜华教授治疗自身免疫性甲状腺炎的临床经验[J]. 世界科学技术－中医药现代化，2020，22(10)：3456－3460.

[4] 张毅. 林真寿老中医治疗桥本甲状腺炎疗效及机制研究[J]. 中华中医药学刊，2019，37(10)：2492－2495.

[5] 付露，崔云竹. 程益春应用药对治疗桥本甲状腺炎经验[J]. 山东中医药大学学报，2017，41(5)：450－453.

[6] JANYGA S, MAREK B, KAJDANIUK D, et al. $CD4^+$ cells in autoimmune thyroid disease [J]. Endokrynol Pol, 2021, 72(5): 572－583.

[7] 杨潇，高天舒，周喜玉，等. 芪蛎消瘿汤对 NOD. H－2^{h4} 小鼠甲状腺 $CD4^+$ T 细胞亚群影响的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20(6)：149－153.

[8] 杨潇，李国信，王智民，等. 中药干预自身免疫性甲状腺炎的研究现状和展望[J]. 世界科学技术－中医药现代化，2017，19(5)：865－869.

[9] 乔佳君，袁泉，赵翊昆，等. 补中益气汤对实验性自身免疫性甲状腺炎大鼠免疫失衡的调节及作用机制研究[J]. 北京中医药，2023，42(3)：268－274.

[10] 杨潇，王智民，曹慧敏，等. 基于 miR－155/SOCS1/STAT3 轴探讨补中益气汤含药血清对 AIT 小鼠 Th17 细胞分化影响[J]. 中华中医药学刊，2022，40(12)：153－157.

[11] 牛春雪，马蕾，薛海波，等. Notch1 信号通路参与自身免疫性疾病发病机制的研究进展[J]. 现代免疫学，2020，40(1)：67－71.

[12] LI C, YUAN J H, ZHU Y F, et al. Imbalance of Th17/treg in different subtypes of autoimmune thyroid diseases[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 40(1－2): 245－252.

[13] SZMYRKA－KACZMAREK M, KOSMACZEWSKA A, CISZAK L, et al. Peripheral blood Th17/Treg imbalance in patients with low－active systemic lupus erythematosus[J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2014, 68: 893－898.

[14] BETTELLI E, OUKKA M, KUCHROO V K. T(H)－17 cells in the circle of immunity and autoimmunity[J]. Nat Immunol, 2007, 8(4): 345－350.

[15] GAVIN M A, RASMUSSEN J P, FONTENOT J D, et al. Foxp3－dependent programme of regulatory T－cell differentiation[J]. Nature, 2007, 445(7129): 771－775.

[16] 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): 5054－5060.

[17] ZHAO N, ZOU H J, QIN J, et al. microRNA－326 contributes to autoimmune thyroiditis by targeting the Ets－1 protein[J]. Endocrine, 2018, 59(1): 120－129.

[18] BOTELLO A, HERRÁN M, SALCEDO V, et al. Prevalence of latent and overt polyautoimmunity in autoimmune thyroid disease: a systematic review and meta－analysis[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2020, 93(4): 375－389.

[19] MARTIN T C, ILIEVA K M, VISCONTI A, et al. Dysregulated antibody, natural killer cell and immune mediator profiles in autoimmune thyroid diseases[J]. Cells, 2020, 9(3): 665.

[20] 楼鹏飞，乔佳君，王悦竹，等. 补中益气汤对自身免疫性甲状腺炎模型大鼠甲状腺抗体及 Th 相关细胞因子的影响[J]. 北京中医药大学学报，2022，45(10)：1037－1043.

[21] 陈雪莹，高天舒. 补中益气汤对自身免疫性甲状腺炎模型小鼠海马微血管结构及 Th17/Treg 轴相关细胞因子水平的影响[J]. 时珍国医国药，2024，35(1)：25－29.

[22] HOU X, ZHOU J, YANG R, et al. Effect of halofuginone on the pathogenesis of autoimmune thyroid disease in different mice models [J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2017, 17(2): 141－148.

[23] SHAO S Y, YU X F, SHEN L Y. Autoimmune thyroid diseases and Th17/treg lymphocytes[J]. Life Sci, 2018, 192: 160－165.

[24] MOSCHEN A R, TILG H, RAINE T. IL－12, IL－23 and IL－17 in IBD: immunobiology and therapeutic targeting[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(3): 185－196.

[25] CAI T T, WANG G F, YANG Y P, et al. Association between polymorphisms of IL－23/IL－17 pathway and clinical phenotypes of autoimmune thyroid diseases[J]. Iran J Immunol, 2022, 19(2): 139－149.

[26] PANDIYAN P, ZHU J F. Origin and functions of pro－inflammatory cytokine producing $Foxp3^+$ regulatory T cells[J]. Cytokine, 2015, 76(1): 13－24.

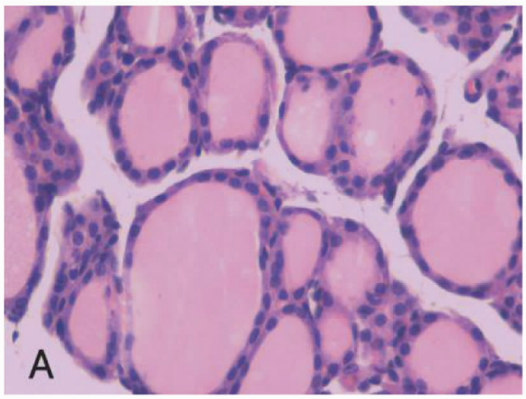
[27] 李泽垄，李智奇，喻涛. 基于 Notch1/ROR－γt 信号通路研究芹菜素对自身免疫性甲状腺炎小鼠的保护作用[J]. 广东药科大学学报，2021，37(6)：89－94.

[28] 赵连春，牛丽霞，陈芳，等. Notch1/ROR－γt 通路在自身免疫性甲状腺炎发病过程中的作用研究[J]. 标记免疫分析与临床，2021，28(3)：492－498.

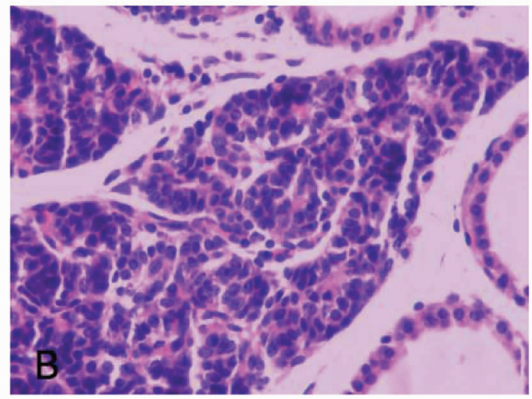
[29] 赵卓，宋囡，刘子玉，等. 补中益气汤对 AIT 小鼠 Th17/Treg 免疫失衡及 Notch1 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2024，30(5)：19－27.

补中益气汤通过 Notch1/ROR－γt/Foxp3 信号通路控制 Th17/Treg 免疫失衡调控 AIT 炎症损伤的机制

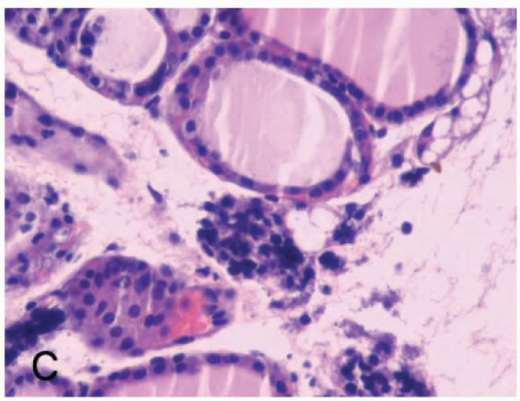
（正文见 84－89 页）



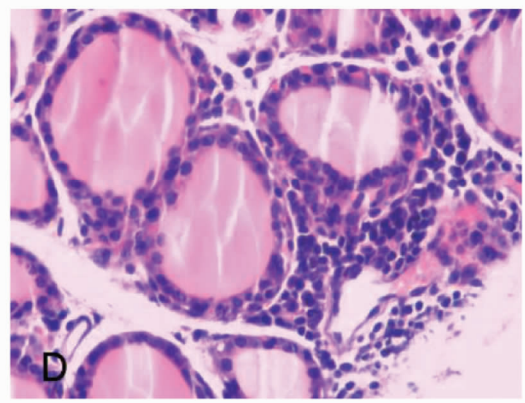
空白组



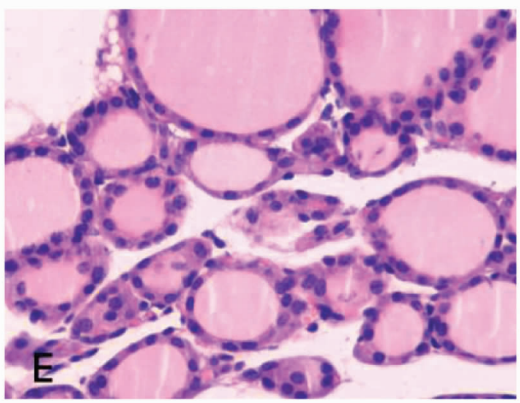
模型组



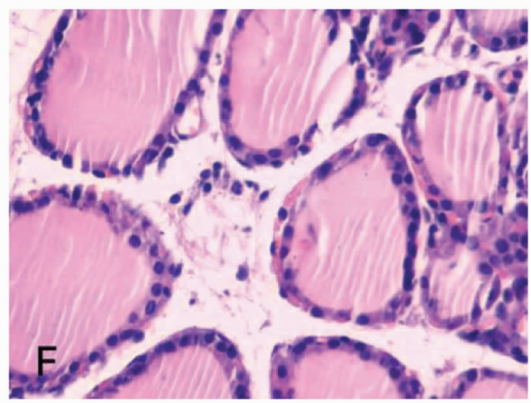
补中益气汤低剂量组



补中益气汤中剂量组



补中益气汤高剂量组



西药组

图 1 补中益气汤对小鼠甲状腺组织形态的影响（HE，×400）

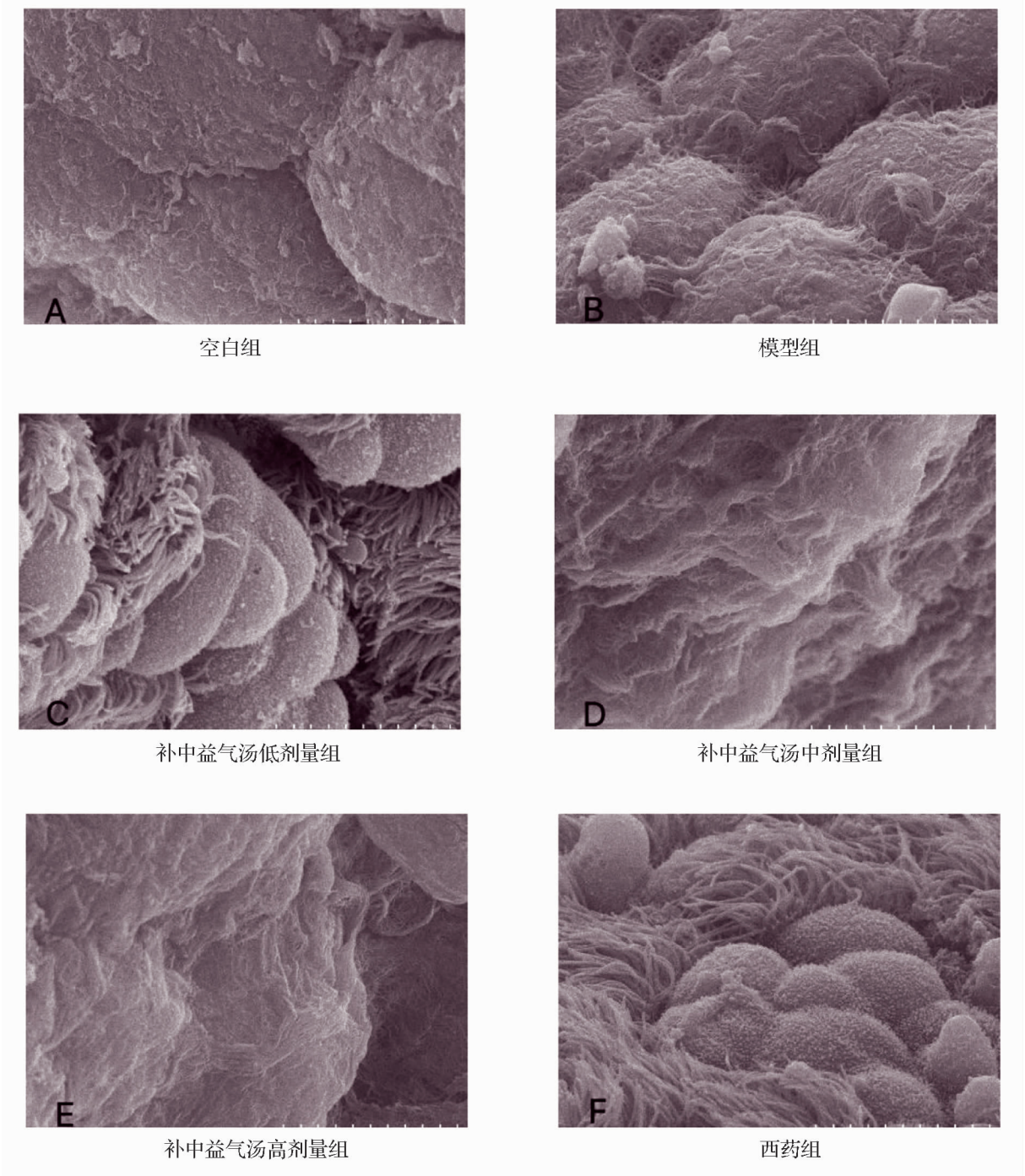


图2 补中益气汤对小鼠甲状腺组织形态的影响(SEM,×5000)