DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20250709.004
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20250709.1557.008

四逆散对自身免疫甲状腺炎小鼠Th17/Treg平衡的调控机制

谭智英[1],杜立娟[2],贾在金[2]✉,薛海波[3]✉,刘俊香[2],郝梅菊[2],毛真真[2],贾建营[2],叶 蕾[1],李 杰[1]

(1.滨州医学院中医学院,山东 滨州 256600;2.滨州市中医医院,山东 滨州 256600;3.滨州医学院附属医院,山东 滨州 256600)

[摘要] **目的**:基于Th17/Treg细胞平衡探讨四逆散治疗实验性自身免疫甲状腺炎(experimental autoimmune thyroiditis, EAT)小鼠的作用机制。**方法**:将30只C57BL/6小鼠随机分为对照组、模型组、硒酵母组(26 μg/kg)、四逆散低剂量组(3.89 g/kg)、四逆散高剂量组(15.6 g/kg)。除对照组外,其余小鼠通过高碘水(NaI)喂养和皮下多点注射含有弗氏佐剂的猪甲状腺免疫球蛋白(PTg)构建EAT模型。模型构建成功后,硒酵母组及四逆散各组根据体重给予相应剂量的药物灌胃。对照组及模型组每日给予等体积的蒸馏水灌胃,连续干预6周后,H&E染色检测甲状腺组织炎症程度;免疫组化检测甲状腺组织RORγt、FOXP3蛋白表达;ELISA检测各组小鼠血清中TPOAb、TGAb、IL-17A、IL-6、TGF-β、IL-10的水平;流式细胞术检测各组小鼠脾脏SMCs中Th17和Treg的比例变化;Western blot检测各组小鼠脾脏STAT3、p-STAT3、STAT5、p-STAT5、FOXP3、RORγt的表达。**结果**:与模型组小鼠相比,四逆散治疗组小鼠甲状腺结构破坏及淋巴细胞浸润程度减轻;甲状腺组织中RORγt表达明显下降($P<0.05$)、FOXP3表达明显升高($P<0.05$);血清中TPOAb、TGAb水平明显下降($P<0.05$);IL-6、IL-17A、TGF-β水平明显下降($P<0.05$);IL-10水平明显升高($P<0.000\ 1$);Th17/Treg细胞比例明显下降($P<0.001$);p-STAT3/STAT3、RORγt蛋白表达明显降低($P<0.05$);p-STAT5/STAT5、FOXP3蛋白表达升高($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论**:四逆散能明显减轻EAT小鼠的炎症反应,其机制可能与恢复Th17/Treg细胞平衡有关。

[关键词] 四逆散;自身免疫甲状腺炎;Th17/Treg细胞平衡;细胞因子;细胞免疫
[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 2097-5953(2026)21-1621-09

Regulation mechanism of Th17/Treg balance in mice with autoimmune thyroiditis induced by Si Ni San

TAN Zhiying[1], DU Lijuan[2], JIA Zaijin[2]✉, XUE Haibo[3]✉, LIU Junxiang[2], HAO Meiju[2], MAO Zhenzhen[2], JIA Jianying[2], YE Lei[1], LI Jie[1]

(1. *School of Traditional Chinese Medicine, Binzhou Medical University. Binzhou* 256600, *China*; 2. *Binzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Binzhou* 256600, *China*; 3. *Binzhou Medical University Binzhou Hospital, Binzhou* 256600, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by the Shandong Provincial Natural Science Foundation General Project* (*ZR2022MH175*); *The Seventh Batch of National Senior Traditional Chinese Medicine Expert Apprenticeship Projects* (202276); *Binzhou Medical College Traditional Chinese Medicine Special Project*(2023*ZYZX*08)

[*Author*]: *TAN Zhiying, E-mail*: 1140511881@*qq.com*.
[*Correspondence to*]: *JIA Zaijin, Chief Physician, Master's Supervisor, E-mail*: *jiazaijin*123@*sina.com*; *XUE Haibo, Chief Physician, Master's Supervisor, E-mail*: *xuehaibo@sina.com*.

Received: 2025-03-28 *Revised*: 2025-07-03 *JHMU*, 2026;32(21):1621-1629

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[基金项目] 山东省自然科学基金面上项目(ZR2022MH175);第七批全国老中医药专家师承项目(202276);滨州医学院中医药专项(2023ZYZX08)

[作者简介] 谭智英,E-mail:1140511881@qq.com。
[通讯作者] 贾在金,主任医师,硕士研究生导师,E-mail:jiazaijin123@sina.com;薛海波,主任医师,硕士研究生导师,E-mail: xuehaibo@sina.com。

[收稿日期] 2025-03-28 [修回日期] 2025-07-03 网络出版时间:2025-07-10 10:09:57

[Abstract] Objective: To explore the mechanism of Si Ni San in the treatment of experimental autoimmune thyroiditis (EAT) in mice based on the Th17/ Treg cell balance. Methods: A total of thirty C57BL/6 mice were randomly divided into 5 groups: the control group, the model group, the selenium yeast group(26 μg/kg), the Si Ni San low-dose group (3.89 g/kg), and the Si Ni San high-dose group(15.6 g/kg). Except the control group, the other mice were fed with high-iodine water (NaI) and subcutaneous multi-point injection of porcine thyroid immunoglobulin (PTg) containing Fredrin′s adjuvant to construct the EAT model. After the model was successfully constructed, corresponding doses of drugs were given to the selenious group and Si Ni San groups according to body weight, and the control group and model group were given equal volume of still water intragastric infusion every day. H&E pathologies were observed in thyroid tissues after continuous intervention for 6 weeks. The protein expression of RORγt and FOXP3 were detected by immunohistochemistry. ELISA was used to analyze the thyroglobulin antibodies TPOAb, TGAb, IL-17A, IL-6, TGF-β and IL-10 in serum of each group ; Flow cytometry was used to detect the proportion of Th17 and Treg in spleen mononuclear cells of mice in each group. The expression of STAT3 、p-STAT3 、STAT5、p-STAT5、FOXP3 and RORγt in spleen of mice in each group was detected by Western blot. Results: Compared to the model group, the damage of thyroid structure and lymphocyte infiltration in Si Ni San group were reduced. The expression of RORγt in thyroid tissue was significantly decreased ($P<0.05$) and FOXP3 expression was significantly increased ($P<0.05$). Serum concentrations of TPOAb and TGAb were significantly decreased ($P<0.05$); The concentrations of IL-6, IL-17 and TGF-β were significantly decreased ($P<0.05$). IL-10 concentration was significantly increased ($P<0.000\ 1$). The proportion of Th17/Treg cells decreased significantly ($P<0.001$). The protein expressions of P-STAT3 /STAT3 and RORγt were significantly decreased ($P<0.05$). The protein expressions of P-STAT5 /STAT5 and FOXP3 were increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Conclusion: Si Ni San significantly alleviates inflammatory responses in EAT mice, which may be related to the restoration of Th17/Treg cell balance.

[Key words] Si Ni San; Autoimmune thyroiditis; Th17/Treg cell balance; Cytokines; Cellular immunity

自身免疫甲状腺炎(autoimmune thyroid,AIT)是一种以甲状腺抗体异常升高为特征的器官特异性自身免疫疾病。发病率逐年升高,女性多见[1]。发病因素与遗传、环境密切相关[2]。其特征性病理表现为大量淋巴细胞浸润甲状腺组织致甲状腺滤泡细胞破坏、萎缩[3]。AIT的发病机制尚不明确,但已知Th17和Treg免疫失衡参与AIT的发生、发展[4]。Th17细胞和Treg细胞同源于$CD4^+$T淋巴细胞,在特定细胞因子微环境的作用下分化为功能相反的细胞亚群,Th17细胞通过分泌白介素-17A(interleukin-17A,IL-17A)、白介素-22(interleukin-22,IL-22)促进甲状腺组织的炎症损伤,而Treg细胞则通过分泌白介素-10(interleukin-10,IL-10)抑制免疫反应[4]。AIT发病初期会有甲状腺功能亢进,持续时间短,最终向甲状腺功能减退发展。目前尚无特异性治疗措施,对于已经发展为甲状腺功能减退的患者,给予左甲状腺素钠补充替代治疗,但是存在骨质疏松等副作用,严重危害人们健康[1]。因此探索安全有效的治疗策略势在必行。

中医药治疗AIT具有疗效好、副作用少等优势。四逆散(Si Ni San,SNS)出自《伤寒论·辨少阴病脉证并治》[5],由柴胡、白芍、枳实、甘草组成。研究表明,四逆散具有抗炎和调节免疫作用,其通过调节Th17/Treg平衡明显减轻溃疡性结肠炎小鼠免疫损伤[6]。临床上应用四逆散加减治疗AIT能明显降低患者甲状腺抗体水平并改善其乏力、失眠等临床症状[7]。然而,四逆散治疗AIT的具体作用机制尚未阐明,亟待深入研究。基于此,本研究旨在通过构建实验性自身免疫甲状腺炎(experimental autoimmune thyroiditis,EAT)动物模型,探讨四逆散治疗AIT的作用机制,为AIT的中医药治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6~8周龄的雌性C57BL/6小鼠30只,体重15~18 g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,许可证号:SCXK(鲁)2022006,饲养于滨州医学院附属医院的SPF级动物房。随机选取6只小鼠为对照(Control)组,其余的24只小鼠则用于构建EAT模型。

1.2 实验药物

四逆散(药物组成为柴胡、白芍、麸炒枳实、炙甘草各15 g),购于滨州市中医医院药房(江阴天江药业有限公司生产免煎中药颗粒,批号分别为2304146301、2301429302、2302495301、2303343301),硒酵母片(牡丹江灵泰药业股份有限公司,批号:221116)。

1.3 主要试剂与仪器

猪甲状腺免疫球蛋白(porcine thyroid immnunoglobulin ,PTg)(批号:T1126,Sigma公司)、完全弗氏佐剂(compete Freund′s adjuvant,CFA)、不完全弗氏佐剂(incomplete Freund′s adjuvant,IFA)(批号分别为AR001、F5506,Sigma公司);苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining,H&E)染色试剂盒

（批号：G1120，北京索莱宝科技有限公司）；即用型免疫组化试剂盒（批号：2309139706E，福州迈新生物技术开发有限公司）；甲状腺球蛋白抗体（thyroglobulin antibodies，TGAb）、IL-17A、转化生长因子-β（transforming growth factor-β，TGF-β）、白介素-6（interleukin-6，IL-6）、IL-10、甲状腺过氧化物酶抗体（thyroid peroxidase antibodies，TPOAb）ELISA试剂盒（批号分别为YJ037680、YJ037864、YJ057830、YJ063159、YJ037873、YJ002215，上海酶联生物科技有限公司）；PerCP-Cy5.5 Rat Anti-Mouse CD4、PE Rat Anti-Mouse IL-17A、BB700 Rat Anti-Mouse CD25、Alexa Fluor 647 Rat anti-Mouse Foxp3（批号分别为550954、559502、566498、560401，BD Pharmingen公司）；信号转导及转录激活因子3（signal transducer and activator of transcription3，STAT3）、p-STAT3、信号转导及转录激活因子5（signal transducer and activator of transcription5，STAT5）、p-STAT5抗体（批号分别为3771、3230、9145、4904，cell signaling technology公司）；维甲酸相关孤儿受体γt（retinoic acid-related orphan receptor γt，RORγt）、叉头框蛋白P3（forkhead box P3，FOXP3）抗体（货号：bs-10647R、bs-10211R，北京博奥森生物有限公司）；β-actin抗体（货号：ABL1010，Abbkin公司）；山羊抗兔IgG（货号：ZB-2301，北京中杉金桥有限公司）。

电泳仪（美国Bio-Rad公司）；光学显微镜（日本OLYMPUS公司）；流式细胞检测分析仪（贝克曼库尔特生物科技有限公司）；化学发光成像仪（上海勤翔科学仪器有限公司）；酶标检测仪（美国Thermo公司）。

1.4 EAT小鼠模型制备

造模方法参考文献[8]。实验期间造模组小鼠给予自由饮用含0.064%碘化钠的水，对照组给予自由饮用高压灭菌水。将PTg溶解在磷酸盐缓冲液（PBS）中，与等体积的CFA混合，配制初次免疫制剂（浓度为2 mg/mL）。将IFA与PTg等体积混合配制再次免疫制剂（浓度为2 mg/mL）。在实验的第一周，造模组每只小鼠给予100 μL的初次免疫制剂多点皮下注射，注射部位为背部及双侧腹股沟。实验第二周开始，造模组每只小鼠给予100 μL的再次免疫制剂多点皮下注射，注射部位同初次免疫，每周1次，连续7周。对照组的小鼠在相同部位给予等量的PBS皮下注射。造模的成功标准为EAT小鼠血清中TGAb水平较对照组升高。本项研究已获得滨州医学院附属医院动物伦理委员会的批准，伦理审批编号为20230206-60。

1.5 药物配制及给药

小鼠每日四逆散用药剂量参照70 kg成人1日中药用量的等效临床剂量和体表面积公式计算出四逆散中剂量为7.79 $g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$，低剂量为其1/2浓度（3.89 $g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$）和高剂量为其2倍浓度（15.6 $g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$）。硒酵母溶液按26 $\mu g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$浓度配置。以上药物配置都使用高压灭菌水。按随机数表法将EAT小鼠随机分为模型（Model）组、硒酵母（Selenious）组、四逆散低剂量（SNS-low）组、四逆散高剂量（SNS-high）组，每组6只。第9周起，四逆散治疗组小鼠给予配置好的低、高剂量中药药液灌胃；硒酵母治疗组小鼠给予配置好的硒酵母溶液灌胃；模型组及正常组予等体积高压灭菌水灌胃。各组连续给药6周。

1.6 标本采集

在给药完毕后，所有小鼠禁食禁水12 h，称重并麻醉小鼠，75%酒精消毒全身后，打开胸腔，充分暴露心脏，心脏采血约0.3～0.8 mL，血液于室温静置30 min，以4 ℃ 3 000 r/min离心20 min，取上层血清置－80 ℃保存待检。颈部正中切开，逐层分离后充分暴露气管，分离甲状腺，置于4%多聚甲醛固定。打开腹腔，剥离脾脏，置于无菌离心管中，一部分用于制备单个核细胞，剩余部分置于－80 ℃冷冻保存。

1.7 H&E染色观察甲状腺组织形态学变化

将甲状腺组织切片置于梯度乙醇脱水，二甲苯透明后，石蜡包埋，切成厚度约4 μm薄片，根据H&E试剂盒操作步骤进行染色，显微镜下观察。

1.8 免疫组化检测甲状腺组织RORγt、FOXP3的表达

将厚度约4 μm甲状腺组织切片，经二甲苯脱蜡和梯度乙醇脱水后，将组织切片置于pH 6.0柠檬酸盐缓冲液，在微波炉加热至修复液接近沸腾后，维持10 min。待组织切片自然冷却后。。滴加内源性过氧化物酶阻断剂，室温下孵育10 min，PBS冲洗3次后，滴加非特异染色阻断剂，孵育10 min，PBS冲洗3次后，滴加稀释好的一抗RORγt（1∶400）和FOXP3（1∶400），4 ℃下孵育过夜，PBS冲洗3次后，滴加生物素标记的IgG聚合物，孵育10 min，PBS冲洗3次后，滴加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶，操作同前。最后滴加DAB显色。封片，显微镜下拍照，并利用ImageJ软件对所得图片进行分析。

1.9 酶联免疫吸附试验（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）法检测小鼠血清TPOAb、

TGAb、IL-17A、IL-6、TGF-β、IL-10的水平

取小鼠血清，根据ELISA试剂盒操作步骤检测，于450 mm测得吸光度并计算浓度。

1.10　流式细胞术检测小鼠脾脏Th17/Treg淋巴细胞比例

根据小鼠脾脏单个核细胞提取试剂盒指南提取单个核细胞（splenic mononuclear cells，SMCs）。Th17细胞的制备：先用钙离子霉素和Phorbol 12-myristate 13-acetate刺激1 h，随后用Brefeldin A继续刺激4 h，将细胞浓度调整至1×10^6个/mL。准备8只流式细胞管，标记为空白、CD4、IL-17A、对照及样品管。向管中加入细胞悬液，CD4管、对照和样品管加入CD4抗体后4 ℃避光孵育；洗涤后加入破膜缓冲液继续4 ℃避光孵育；洗涤，IL-17A管、对照和样品管加入IL-17A抗体孵育，洗涤后重悬细胞，流式细胞仪上机检测。

Treg细胞的制备：取9只流式细胞管，标记为空白、CD4、CD25、FOXP3、对照及样品管。加入细胞悬液，CD4管、对照管和样品管加入CD4抗体，CD25、对照管和样品管加入CD25抗体后4 ℃避光孵育；洗涤后加入破膜缓冲液孵育；洗涤，FOXP3管、对照管和样品管加入FOXP3抗体孵育，洗涤后重悬细胞，流式细胞仪上机检测。

1.11　蛋白质印迹法（Western blot）检测脾脏STAT3、p-STAT3、STAT5、p-STAT5、RORγt、FOXP3蛋白表达

从脾脏组织中提取总蛋白，经离心分离上清液后，BCA法测定蛋白浓度。蛋白样本在95 ℃水浴中变性处理，配制8%的SDS-PAGE凝胶进行蛋白上样和电泳分离。电泳后，转膜，使用5%BSA溶液在室温下封闭2 h。封闭后，TBST洗涤，然后把条带放入稀释至相应比例的一抗STAT3（1∶2 000）、p-STAT3（1∶2 000）、STAT5（1∶2 000）、p-STAT5（1∶2 000）、RORγt（1∶1 000）、FOXP3（1∶1 000）、β-actin（1∶10 000），4 ℃下孵育过夜后，TBST洗涤3次，每次10 min；将条带置于稀释好的二抗（1∶10 000），室温孵育1 h。TBST洗涤3次，每次10 min，曝光显影后，用ImageJ软件进行分析。

1.12　统计学处理

运用SPSS 26.0与GraphPad Prism 10软件对实验数据进行分析，符合正态分布且方差齐性的计量数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组比较采用ANOVA单因素方差分析，$P<0.05$为差异具有统计学意义。

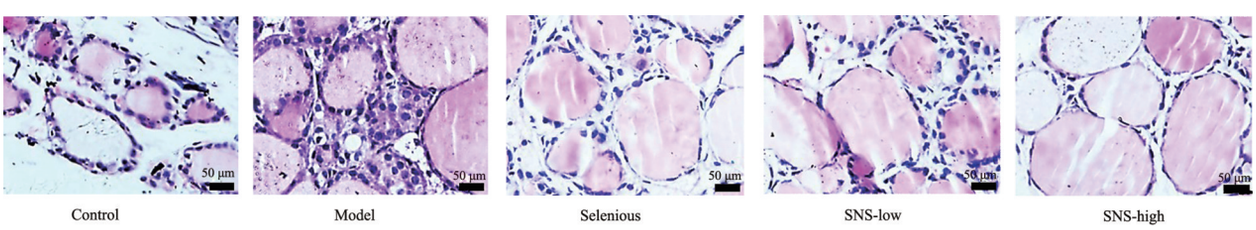
2　结果

2.1　各组小鼠甲状腺组织病理形态

对照组小鼠的甲状腺滤泡结构完整，滤泡间隙无淋巴细胞浸润。与对照组相比，模型组小鼠甲状腺滤泡大小不一，大部分滤泡细胞遭受破坏并出现萎缩，滤泡间隙有大量的淋巴细胞浸润，提示造模成功。与模型组相比，硒酵母组、四逆散低、高剂量组小鼠甲状腺滤泡细胞破坏和萎缩均出现不同程度的减少，滤泡间隙中浸润的淋巴细胞面积也减少，以高剂量组效果更明显。表明四逆散可以明显减轻EAT小鼠甲状腺炎症反应。见图1。

2.2　各组小鼠甲状腺组织中RORγt、FOXP3蛋白表达

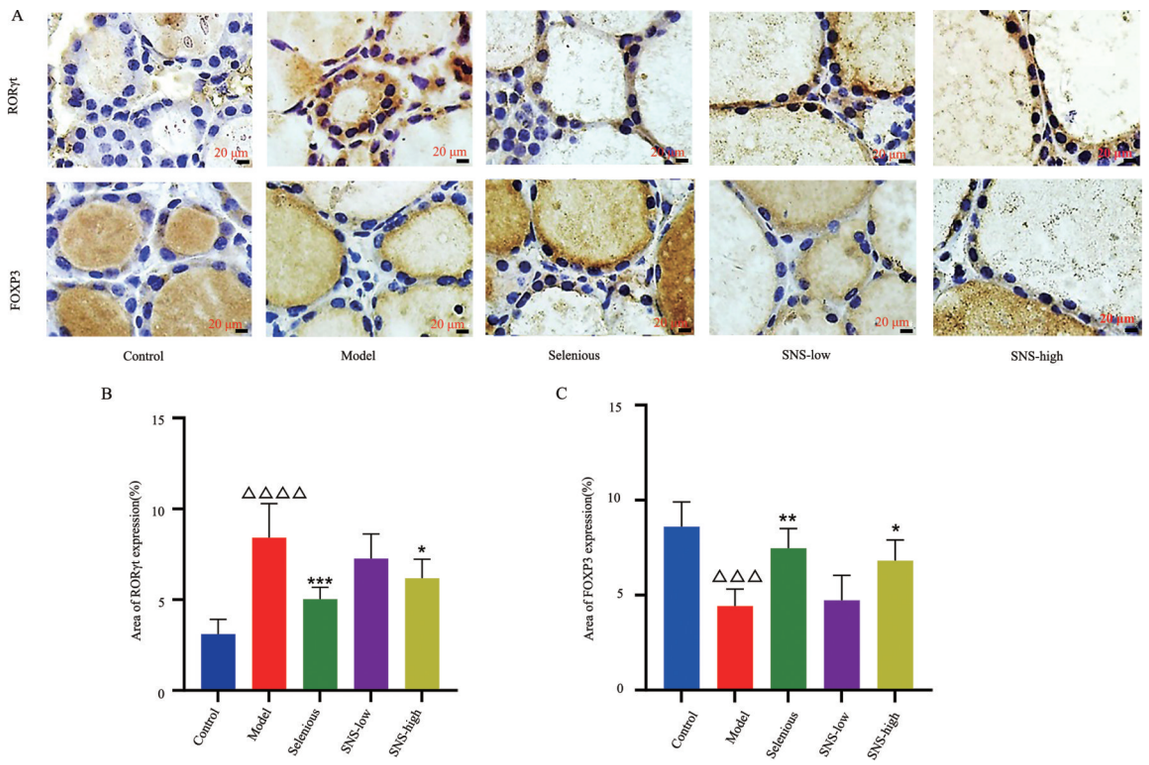
免疫组化染色观察并分析各组小鼠甲状腺组织RORγt、FOXP3蛋白表达，模型组小鼠甲状腺组织中RORγt蛋白表达较对照组明显升高（$P<0.000\ 1$），FOXP3蛋白表达明显降低（$P<0.001$）；提示模型组中存在Th17/Treg失衡。硒酵母干预后小鼠甲状腺组织中RORγt蛋白表达较模型组明显下降（$P<0.001$），FOXP3蛋白表达较模型组明显升高（$P<0.01$）；四逆散高剂量干预后RORγt蛋白表达较模型组明显下降（$P<0.05$），FOXP3蛋白表达较模型组明显升高（$P<0.05$）。见图2。



Control：对照组；Model：模型组；Selenious：硒酵母组；SNS-low：四逆散低剂量组；SNS-high：四逆散高剂量组

图1　各组小鼠甲状腺组织病理形态（200×，比例尺=50 μm）

Fig1　Histopathological morphology of mice thyroid tissue in various groups（200×，Scale bar=50 μm）



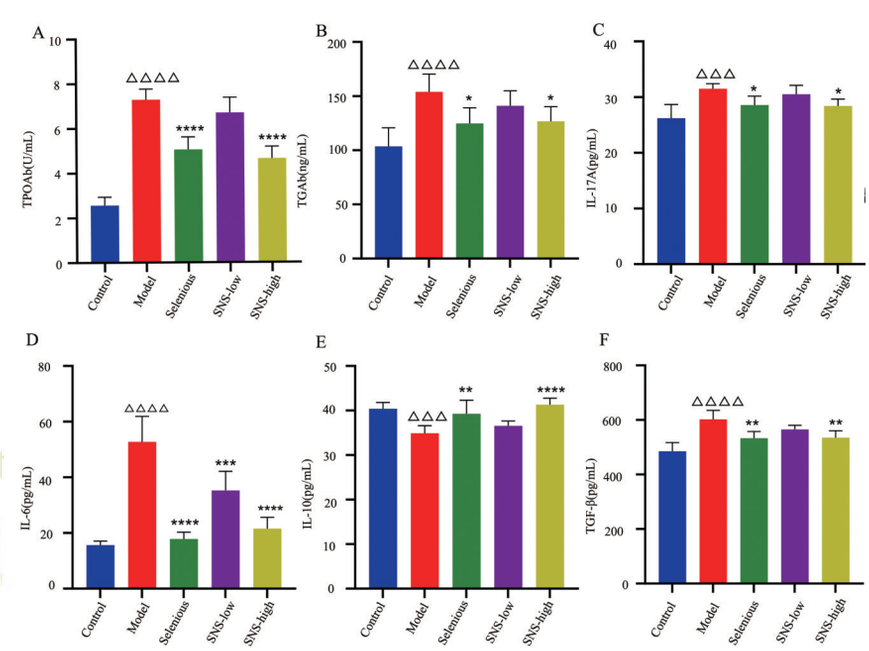
A:各组小鼠甲状腺组织RORγt、FOXP3免疫组化示意图(400×,比例尺=20 μm);B:各组小鼠甲状腺组织RORγt阳性面积统计分析;C:各组小鼠甲状腺组织FOXP3阳性面积统计分析;与正常组比较,$^{\triangle\triangle\triangle\triangle}P<0.000\,1$,$^{\triangle\triangle\triangle}P<0.001$;与模型组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$;$n=6$

图2　各组小鼠甲状腺组织中RORγt、FOXP3的表达

Fig 2　Expression of RORγt and FOXP3 in Mice Thyroid Tissue in various groups

2.3　各组小鼠血清中TPOAb、TGAb比较

与对照组相比,模型组小鼠TPOAb、TGAb明显升高($P<0.000\,1$)。与模型组相比,硒酵母组TPOAb、TGAb明显降低($P<0.05$);四逆散高剂量组TPOAb、TGAb明显降低($P<0.05$),见图3A,B。



与正常组比较$^{\triangle\triangle\triangle}P<0.001$,$^{\triangle\triangle\triangle\triangle}P<0.000\,1$;与模型组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$,$^{****}P<0.000\,1$;$n=6$

图3　各组小鼠血清甲状腺抗体及细胞因子浓度比较

Fig3　Comparison of serum thyroid antibodies and cytokine concentrations among different groups of mice

2.4　各组小鼠血清中 IL-17A、IL-6、IL-10、TGF-β 浓度比较

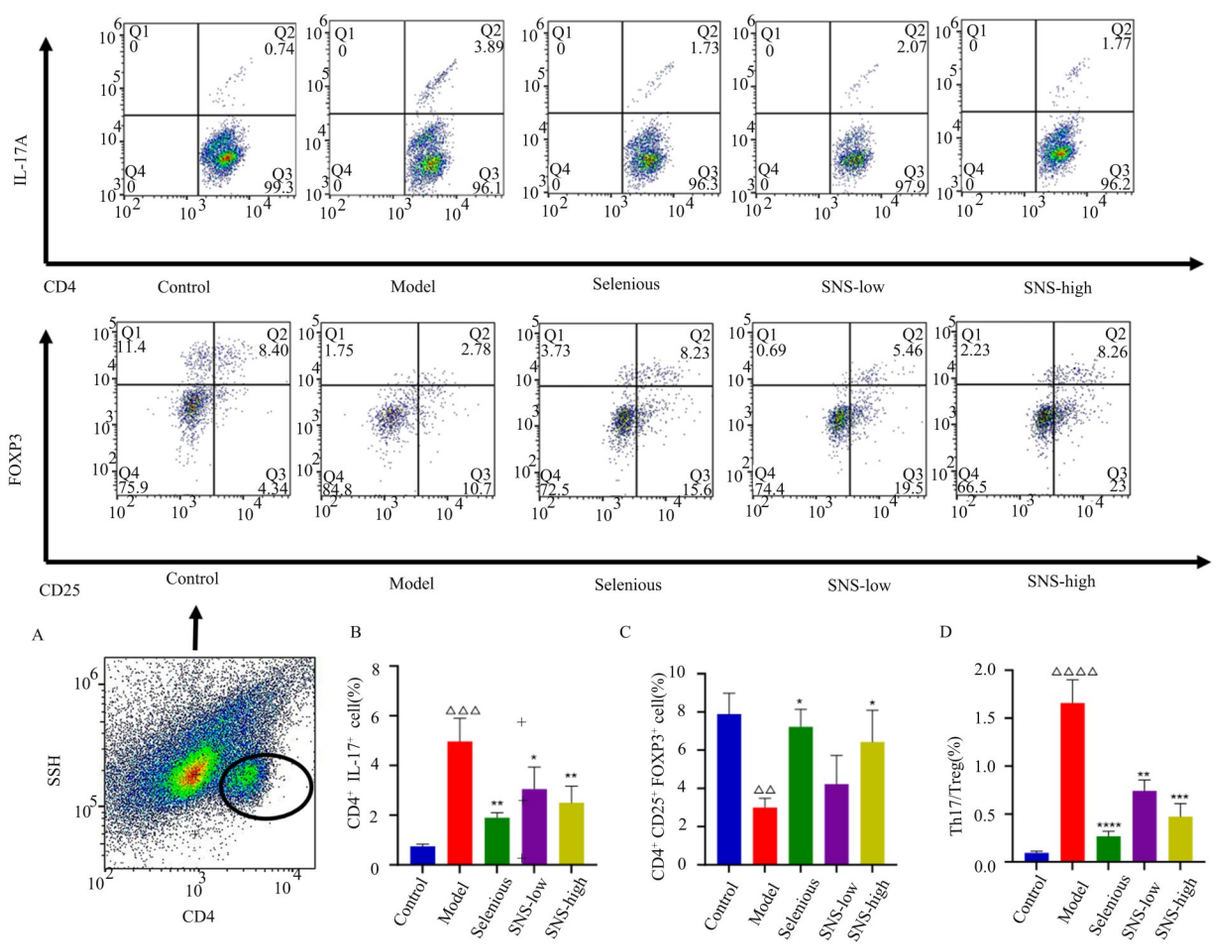
与对照组相比，模型组小鼠 IL-17A、IL-6、TGF-β 明显升高（$P<0.001$），IL-10 明显降低（$P<0.001$）；与模型组相比，硒酵母组 IL-17A、IL-6、TGF-β 明显降低（$P<0.05$），IL-10 明显升高（$P<0.01$）；四逆散低剂量组 IL-6 降低（$P<0.001$），IL-10 升高；四逆散高剂量组 IL-17A、IL-6、TGF-β 明显降低（$P<0.05$），IL-10 明显升高（$P<0.000\ 1$）。见图 3C～F。

2.5　各组小鼠脾脏单个核细胞中 Th17/Treg 细胞比较

与对照组相比，模型组小鼠 Th17（$CD4^+IL17^+$）细胞明显升高（$P<0.001$），Treg（$CD4^+CD25^+FOXP3^+$）细胞明显下降（$P<0.01$），Th17/Treg 细胞比例明显升高（$P<0.000\ 1$）；与模型组相比，硒酵母组小鼠 Th17（$CD4^+IL17^+$）细胞明显降低（$P<0.01$），Treg（$CD4^+CD25^+FOXP3^+$）细胞明显升高（$P<0.05$），Th17/Treg 细胞比例明显下降（$P<0.000\ 1$）；四逆散低剂量组小鼠 Th17（$CD4^+IL17^+$）细胞明显降低（$P<0.05$），Treg（$CD4^+CD25^+FOXP3^+$）细胞升高，Th17/Treg 细胞比例明显下降（$P<0.01$）；四逆散高剂量组小鼠 Th17（$CD4^+IL17^+$）细胞明显降低（$P<0.01$），Treg（$CD4^+CD25^+FOXP3^+$）细胞明显升高（$P<0.05$），Th17/Tre 细胞比例明显下降（$P<0.001$）。见图 4。

2.6　各组小鼠脾脏 p-STAT3/STAT3、p-STAT5/STAT5、RORγt、FOXP3 蛋白表达

Western blot 观察各组小鼠脾脏 p-STAT3/STAT3、p-STAT5/STAT5、RORγt、FOXP3 蛋白表达，模型组小鼠 p-STAT3/STAT3、RORγt 蛋白表达较对照组明显升高（$P<0.05$），p-STAT5/STAT5、FOXP3 蛋白表达较对照组明显下降（$P<$

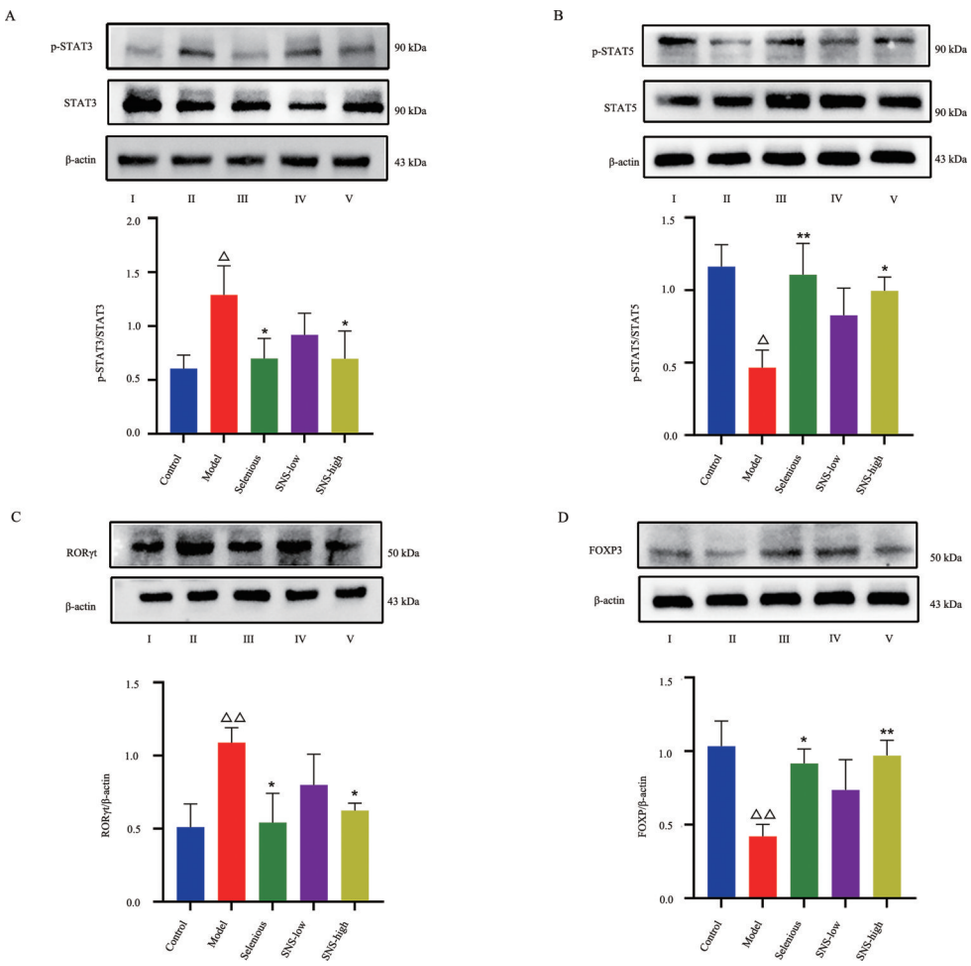


A：各组小鼠 SMCs 中 Th17、Treg 细胞流式分析示意图；B：各组小鼠 SMCs 中 Th17 细胞比例图；C：各组小鼠 SMCs 中 Treg 细胞比例图；D：各组小鼠 SMCs 中 Th17/Treg 细胞比例图；与正常组比较，$^{\triangle\triangle}P<0.01$，$^{\triangle\triangle\triangle}P<0.001$，$^{\triangle\triangle\triangle\triangle}P<0.000\ 1$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$，$^{****}P<0.001$；$n=3$

图 4　各组小鼠脾脏单个核细胞中 Th17/Treg 细胞比较

Fig 4　Comparison of the propotation of mice Th17/Treg Cells in SMCs in various group

0.05)；硒酵母组小鼠p-STAT3/STAT3、RORγt蛋白表达较模型组明显降低($P<0.05$)、p-STAT5/STAT5、FOXP3蛋白表达较模型组明显升高($P<0.05$)；四逆散高剂量组p-STAT3/STAT3、RORγt蛋白表达较模型组明显降低($P<0.05$)，p-STAT5/STAT5、FOXP3蛋白表达较模型组明显升高($P<0.05$)。见图5。



Ⅰ：对照组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：硒酵母组；Ⅳ：四逆散低剂量组；Ⅴ：四逆散高剂量组；A：p-STAT3/STAT3；B：p-STAT5/STAT5；C：RORγt；D：FOXP3；与对照组比较，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；$n=6$

图5　各组小鼠脾脏Th17、Treg关键转录因子蛋白相对表达量

Fig 5　Relative expression levels of Th17 and Treg key transcription factor proteins in the spleens of mice in each group

3　讨论

AIT起病隐匿，临床上不仅会表现为甲状腺功能异常(如甲状腺功能亢进或减退)，还可能伴随一系列全身症状，包括体重变化、焦虑、全身乏力、心悸和失眠等，严重影响人的身心健康[9]。因此，AIT的早期诊断和干预对于改善患者预后具有重要意义。

AIT属于中医“瘿病”“瘿瘤”范畴，情志失调、饮食不节，先天禀赋不足致肝脾失调、气机郁滞，治疗上应以疏肝健脾、理气解郁为主，旨在恢复机体的阴阳平衡[10]。四逆散为疏肝健脾的经典方剂，从组方分析，柴胡入肝胆经，生发阳气，疏肝解郁，透邪外出，为君药。白芍敛阴，养血柔肝，为臣药，与柴胡合用，以养肝血，条达肝气，使柴胡升散而无耗伤阴血之弊；佐以枳实理气解郁，泄热破结，与柴胡为伍，一升一降，增强舒畅气机、升清降浊之功；与白芍相配，理气和血，使气血调和[11]，甘草调和诸药，益脾和中，四药配伍，疏柔相和，以适肝性，升降同用，肝脾并调，共奏透邪解郁，疏肝理脾之效[11]。现代药理研究表明四逆散在肝炎、肝损伤及慢性胰腺炎的治疗中显示出较强的抗炎和免疫调节作用[12-14]。柴胡皂苷通过促进M2巨噬细胞极化，调节Th17细胞分化，减轻EAT小鼠的甲状腺损伤[15]。白芍总苷调控Th17/Treg平衡减轻EAT大鼠的炎症反应[16]。

EAT小鼠模型与人类的AIT具有相同的病理

学基础和表现，广泛应用于AIT的基础研究，皮下注射猪甲状腺球蛋白和CFA是诱导EAT的常用方法[17]。补硒治疗是AIT治疗手段之一，临床上应用补硒治疗可以降低甲状腺自身抗体水平，改善甲状腺功能，其机制与上调活化的Treg细胞水平相关[18]。本研究通过构建EAT模型，以硒酵母为阳性药，探讨四逆散治疗AIT的作用机制。可以观察到EAT小鼠甲状腺滤泡间隙有大量淋巴细胞浸润，甲状腺滤泡细胞被破坏，萎缩。四逆散不同剂量干预后可以明显减少淋巴细胞浸润面积，减轻甲状腺滤泡细胞破坏程度。

TGAb和TPOAb的升高与淋巴细胞浸润情况成正相关[19]。TPOAb是甲状腺上皮细胞胞浆微粒体抗原诱导产生的抗体，其细胞毒性作用主要依赖于补体介导的细胞损伤机制，可加剧甲状腺组织的病理损害[20]。同时，TGAb与甲状腺蛋白结合后形成抗原-抗体复合物，进一步导致甲状腺细胞的破坏[21]。本研究发现，EAT模型小鼠血清中TPOAb、TGAb较对照组明显升高，四逆散给药干预后，EAT小鼠甲状腺血清TGAb、TPOAb明显降低，以高剂量效果明显，说明四逆散能够抑制机体过度的体液免疫反应，从而减少炎症浸润对甲状腺组织的破坏，促进甲状腺功能的恢复。

细胞因子参与机体细胞免疫，其分泌失调可通过直接或间接途径加剧AIT的自身免疫反应[22]。研究表明TGF-β具有双重调节作用，不仅调控FOXP3的表达，促进Treg的分化，同时也参与了Th17细胞的分化[23]。当机体发生炎症反应时，IL-6水平异常升高，Treg细胞的分化受到抑制，其释放的抑炎因子IL-10水平下降，Th17细胞的分化则被促进，IL-17、IL-22水平异常升高[24]。导致Th17/Treg免疫失衡。本研究结果显示与正常组相比，EAT模型组小鼠血清中的IL-6、IL-17A、TGF-β水平升高，而IL-10水平降低。经过不同剂量四逆散治疗后，IL-6、IL-17A和TGF-β水平降低，IL-10水平升高。说明四逆散通过降低促炎因子水平，升高抑炎因子水平，使$CD4^+$T细胞分化向Treg细胞偏移，一定程度上恢复Th17/Treg平衡，减轻炎症反应。

Th17/Treg细胞免疫失衡促进了AIT的发生、发展[25]。STAT3、RORγt是Th17细胞分化的关键因子，炎性因子激活STAT3能够驱动$CD4^+$T细胞向Th17细胞分化，同时促进炎性因子释放，加剧甲状腺细胞的凋亡[26]。FOXP3和STAT5是Treg细胞中的关键转录因子，磷酸化的STAT5促进FOXP3表达，使$CD4^+$T细胞向Treg细胞分化并释放抑炎因子。此外，FOXP3的表达增加还能抑制Th17细胞分化，恢复Th17/Treg平衡，抑制炎症反应[27-29]。本研究发现，在EAT模型组中，p-STAT3/STAT3、RORγt蛋白表达明显升高，p-STAT5/STAT5、FOXP3蛋白表达明显降低，Th17比例升高，Treg细胞比例下降，Th17/Treg比例升高，Th17/Treg平衡向Th17偏移，加剧炎症反应。四逆散干预后能降低p-STAT3/STAT3、RORγt蛋白表达，升高p-STAT5/STAT5、FOXP3蛋白表达，使失衡的Th17/Treg平衡向Treg偏移，降低Th17细胞的比例，升高Treg细胞的比例，恢复Th17/Treg细胞的平衡，减轻炎症反应。

综上所述，四逆散可减轻EAT小鼠甲状腺炎症及自身免疫损伤，其机制可能通过抑制p-STAT3、RORγt的表达，减少Th17细胞分化；促进p-STAT5、Foxp3的表达，增加Treg细胞分化，恢复Th17/Treg细胞平衡有关。此外，细胞因子水平的调控对Th17/Treg细胞平衡的调节发挥着重要作用。本研究为四逆散治疗AIT的作用机制做了初步揭示。在后续的研究中，将采用转录组学、代谢组学等生物信息学及细胞学等手段开展深入研究，为四逆散治疗AIT及调节免疫提供科学依据。

作者贡献度说明：

贾在金、薛海波：实验方案设计、论文指导与审校；谭智英：动物实验、样本收集、指标检测、数据分析、论文撰写；杜立娟：实验方案设计、指标检测；毛真真、贾建营：样本收集、指标检测；刘俊香，郝梅菊：指标检测、数据分析；叶蕾、李杰：实验技术指导。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Ragusa F, Fallahi P, Elia G, et al. Hashimotos′ thyroiditis: Epidemiology, pathogenesis, clinic and therapy[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2019, 33(6): 101367.

2 Li Y, Teng D, Ba J, et al. Efficacy and safety of long-term universal salt iodization on thyroid disorders: Epidemiological evidence from 31 provinces of mainland China [J]. Thyroid, 2020, 30(4):568-579.

3 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.

4 Zhu H, Mu S, Liu S, et al. Yiqi Jiedu Xiaoying Decoction improves experimental autoimmune thyroiditis in

rats by regulating Th17/Treg cell balance[J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2024, 24(10): 1186-1196.

5 熊曼琪.伤寒论[M].北京:人民卫生出版社,2000: 605-612
Xiong MQ. Treatise on Febrile Diseases[M]. Beijing: People's Medicine Publishing House, 2000: 605-612.

6 蔡雅洁.四逆散改善慢性实验性结肠炎的作用及机制研究[D].北京:北京中医药大学,2022.
Cai YJ. Study on the effect and mechanism of Sini SAN in improving chronic experimental colitis[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2022.

7 张雅琦.四逆散合半夏厚朴汤加减治疗气滞痰凝型桥本甲状腺炎的临床观察[D].济南:山东中医药大学,2023.
Zhang YQ. Clinical observation on the treatment of Hashimoto's thyroiditis caused by Qi stagnation and phlegm coagulation with modified Si Ni SAN combined with Banxia Houpu Decoction [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine 2023.

8 Zhou Y, Shen H, Lan W, et al. Mechanism of Xiaoying Daotan decoction in treating Hashimoto's thyroiditis based on the Notch/Treg/Th17 pathway [J]. Ann Transl Med, 2021, 9(24):1760.

9 Antonelli A, Fallahi P, Elia G, et al. Graves' disease: Clinical manifestations, immune pathogenesis (cytokines and chemokines) and therapy[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2020, 34(1): 101388.

10 吴勉华,石岩,赵进喜,等.中医内科学[M].北京:中国中医药出版社,2021:263-268.
Wu MH, Shi Y, Zhao JX, et al. Internal medicine of traditional Chinese medicine [M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press, 2021:263-268

11 李翼,左铮云,于洋,等.方剂学[M].北京:中国中医药出版社,2021: 65.
Li Y, Zuo ZY, Yu Y, et al. Formulas of Chinese medicine [M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press, 2021:65.

12 Xu W, Du X, Li J, et al. SiNiSan alleviates liver injury by promoting hepatic stem cell differentiation *via* Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Phytomedicine, 2022, 99: 153969.

13 Tang Y, Liao Y, Kawaguchi-Sakita N, et al. Sinisan, a traditional Chinese medicine, attenuates experimental chronic pancreatitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid in rats[J]. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2011, 18(4):551-558.

14 Shu Z, He W, Shahen M, et al. Clarifying of the potential mechanism of Sinisan formula for treatment of chronic hepatitis by systems pharmacology method [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 100:532-550.

15 Du P, Xu J, Jiang Y, et al. Saikosaponin-d attenuates Hashimoto's thyroiditis by regulating macrophage polarization[J]. J Immunol Res, 2022, 2022: 1-12.

16 余欣然,陈云志,牧亚峰.白芍总苷对自身免疫性甲状腺炎大鼠的免疫调节作用[J].中成药,2023, 45(5): 1666-1669.
Yu XR, Chen YZ, MuYF. Immunomodulatory effects of total glycosides of *Paeonia lactiflora* on autoimmune thyroiditis in rats[J]. Chin Tradit Patent Med, 2023, 45(5):1666-1669.

17 Kong YM. Experimental autoimmune thyroiditis in the mouse[J]. Curr Protoc Immunol, 2007, Chapter 15: 15.7.1-15.7.21.

18 Hu Y, Feng W, Chen H, et al. Effect of selenium on thyroid autoimmunity and regulatory T cells in patients with Hashimoto's thyroiditis: A prospective randomized-controlled trial[J]. Clin Transl Sci, 2021, 14(4):1390-1402.

19 邝嘉敏,李颖,梁勇前.TPOAb对良性甲状腺结节微波消融治疗效果的影响[J].吉林医学,2024,45(4):787-789.
Kuang JM, Li Y, Liang YQ. The impact of TPOAb on the efficacy of microwave ablation for benign thyroid[J]. Nodules Jilin Med, 2024, 45(4):787-789.

20 Amiri M, Nazarpour S, Ramezani Tehrani F, et al. The targeted high-risk case-finding approach versus universal screening for thyroid dysfunction during pregnancy: Thyroid-stimulating hormone (TSH) and/or thyroid peroxidase antibody (TPOAb) test?[J]. J Endocrinol Invest, 2022, 45(9):1641-1651.

21 范淑欢,洪开听,潘辉,等.不同孕期甲状腺激素水平与TPOAb和TgAb的相关性分析[J]中国妇幼保健,2025,40(5):794-798.
Fan SH, Hong KT, Pan H, et al. Correlation analysis between thyroid hormone levels and TPOAb and TgAb during different pregnancy periods[J]. Matern Child Health Care China, 2025, 40(5):794-798.

22 袁望圆,刘璐,万琪,等.黄连丸对DSS诱导结肠炎小鼠Th17/Treg平衡的调控机制[J].时珍国医国药.2024, 35(4):835-839.
Yuan WY, Liu L, Wan Q, et al. Regulation of Yulian Pill on Th17 / Treg balance in DDS induced colitis mice [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2024, 35(4): 835-839.

23 Wang J, Zhao X, Wan YY. Intricacies of TGF-β signaling in Treg and Th17 cell biology[J]. Cell Mol Immunol, 2023, 20(9):1002-1022.

(下转第1640页)