

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.19.012

实验研究

化痰散结方对 Graves 病模型小鼠甲状腺血管新生及 VEGFA/VEGFR2 信号通路的影响

马文欣^{1,2}, 朱晓云², 王程娜¹, 徐婧³, 刘喜明², 汤阳¹✉

1. 北京中医药大学, 北京市朝阳区北三环东路 11 号, 100029; 2. 中国中医科学院广安门医院; 3. 北京中医药大学东直门医院

[摘要] **目的** 从甲状腺血管新生角度探讨化痰散结方治疗 Graves 病的可能作用机制。**方法** 36 只 BALB/c 雌性小鼠随机分为正常对照组 9 只和造模组 27 只, 造模组小鼠以 Ad-TSHR289 腺病毒 2.0×10^9 PFU/ml 胫前肌肉注射 100 μ l 构建 Graves 病小鼠模型。免疫后第 9 周将造模成功小鼠随机分为模型组、甲疏咪唑组和化痰散结组, 每组 9 只。甲疏咪唑组小鼠给予甲疏咪唑片 5.2 mg/(kg·d) 灌胃, 化痰散结组小鼠给予化痰散结方相对生药量 7.02 g/(kg·d) 灌胃, 正常对照组与模型组给予纯水 0.1 ml/10 g 灌胃。均每日灌胃 1 次, 共计 4 周。放射免疫法检测各组小鼠血清中甲状腺素 (T4) 和促甲状腺素受体自身抗体 (TRAb) 含量, HE 染色观察甲状腺病理改变情况, CD34 免疫组化染色观察甲状腺组织血管形态并对微血管密度 (MVD) 计数, Western-blot 法检测小鼠甲状腺中血管内皮生长因子 A (VEGFA) 和血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR2) 蛋白表达。**结果** 与正常对照组比较, 模型组小鼠甲状腺体积极明显增大, 存在过度充血, 病理显示甲状腺滤泡增生显著, 上皮细胞呈柱状且增殖明显, 滤泡体积增大; 血清中 T4、TRAb 水平上升, 甲状腺 MVD 计数增多, 甲状腺 VEGFA、VEGFR2 蛋白表达上调 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 甲疏咪唑组和化痰散结组小鼠的甲状腺明显减小, 充血情况有所改善, 病理显示甲状腺滤泡增生和上皮细胞增殖减轻, 滤泡边缘光滑、内凸明显减少; 血清 T4、TRAb 水平降低, 甲状腺 MVD 计数减少, 甲状腺 VEGFA、VEGFR2 蛋白表达量显著下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。甲疏咪唑组和化痰散结组各指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 化痰散结方可能通过下调甲状腺 VEGFA/VEGFR2 信号通路从而抑制甲状腺血管新生, 改善 Graves 病甲状腺肿大和功能亢进。

[关键词] Graves 病; 甲状腺; 血管新生; 血管内皮生长因子; 化痰散结方

Graves 病 (Graves' disease, GD) 是一种临床常见的自身免疫性疾病, 以弥漫性甲状腺肿大和甲状腺功能亢进为特征。GD 的经典治疗方法主要包括抗甲状腺药物、放射性碘和手术切除, 但存在复发率高、易致甲状腺功能丧失等缺陷^[1]。GD 患者甲状腺内存在大量的血管新生, 而甲状腺血管新生是形成甲状腺肿大的重要环节, 血管内皮生长因子 A/血管内皮生长因子受体 2 (VEGFA/VEGFR2) 信号通路在血管新生的过程中起重要作用^[2]。中医药治疗 GD 可缩小甲状腺体积、降低自身免疫反应、显著改善症状, 与西药联用可缩短疗程、减轻不良

反应、降低复发率^[3]。GD 的基本病机为痰火凝结于颈前, 化痰散结、清热消瘿为基本治法^[4]。本团队认为, 甲状腺多气多血, 其生理功能有赖于血脉的濡养, 而甲状腺血脉功能异常可引起 GD 的发生, 其主要病理因素火、痰、瘀的产生与甲状腺血管新生密切相关^[5]。研究显示, 临床应用化痰散结药物治疗 GD 取得了较好疗效^[6], 其中玄参、土贝母、夏枯草为清热消瘿、化痰散结的代表方药^[7-8], 三药合用组成化痰散结方。本团队前期证明化痰散结方可显著改善 GD 小鼠甲状腺肿大^[9], 本研究在此基础上, 从调控甲状腺血管新生及 VEGFA/VEGFR2 信号通路探讨化痰散结方治疗 GD 的可能作用机制。本实验经北京中医药大学伦理委员会审查通过, 批件号: BUCM-4-2021062101-2063。

基金项目: 国家自然科学基金 (82305182, 81774293); 中国博士后科学基金资助项目 (2023M740347)

✉ 通讯作者: 201901008@bucm.edu.cn

1 材料与方法

1.1 动物及腺病毒

SPF级BALB/c雌性小鼠36只,体质量18~20 g,6~8周龄,购于北京华阜康生物科技股份有限公司,实验动物许可证号:SCXK(京)2019-0008。饲养于中国中医科学院广安门医院动物实验中心,温度(25±1)℃,相对湿度55%~65%,12 h/12 h光暗循环,自由摄食饮水。

根据既往研究^[10]建立的造模方法,构建pAV-EX1d-hTSHR289/his/IRES/eGFP质粒载体,包装过表达人TSHR-A亚单位(Ad-TSHR289)的腺病毒,改良后的过表达重组腺病毒由北京东华坊生物技术有限公司包装制备。Ad-TSHR289以适量PBS缓冲液稀释,配置成滴度为 2.0×10^{10} PFU/ml的病毒溶液,置于冰上备用。

1.2 药物

化痰散结方按照玄参、土贝母、夏枯草3:5:10的比例组成。饮片购自中国中医科学院广安门医院中药房,中药饮片精确称量54 g,加水浸泡2 h,煎至200 ml,取出药液后加水再煎,混合两次药液,过滤后浓缩,浓度为0.702 g/ml。甲巯咪唑片(赛治,Merck Healthcare KGaA,国药准字HJ20171155),溶于0.5%羧甲基纤维素钠(CMC)溶液中混悬,浓度为0.52 mg/ml。

1.3 主要试剂及仪器

三碘甲状腺原氨酸(T3)测定试剂盒(SIEMENS Healthineers公司,注册号:国械注进20162404411);甲状腺素(T4)放射免疫法检测试剂盒(货号:OCPG07-T4)、促甲状腺素受体自身抗体(TRA b)放射免疫法检测试剂盒(货号:TR-AB-CT),Cisbio Bioassays公司;HE染色及免疫组化检测试剂:通用型组织固定液(Servicebio公司,货号:G1101);兔抗CD34抗体(成都正能生物有限公司,货号:380824);苏木素-伊红(HE)染色液(货号:BSBA-4027)、兔二步法检测试剂盒(货号:PV-9001)、DAB显色试剂盒(货号:ZLI-9017)、苏木素染色液(货号:ZLI-9610),北京中杉金桥生物技术有限公司;VEGFA抗体(Proteintech公司,货号:19003-1-AP);VEGFR2抗体(成都正能生物有限公司,货号:340401);抗 β -Actin抗体(Abcam公司,货号:ab227387);HRP羊抗兔二抗(货号:074-1506)、HRP羊抗鼠二抗(货号:074-1806)、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(货号:Ba1012)、RIPA总

蛋白裂解液(货号:Ba1004)、BCA蛋白质浓度测定试剂盒(货号:Ba1086)、ECL化学发光检测试剂盒(货号:Ba1059),武汉佰千度公司;蛋白酶抑制剂混合物(ROCHE公司,货号:04693159001);蛋白Marker(Thermo公司,货号:26616);PVDF膜(Millipore公司,货号:IPVH00010)。

GC-2010型免疫计数器(安徽中科中佳科学仪器有限公司);JB-P5型包埋机(武汉俊杰电子有限公司);RM2016型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);eclipse Ti型正置光学显微镜(尼康公司);PP-1105型电泳仪(CAVOY公司);DR-200Bs型酶标仪(Diatek公司);TGL-16c型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);TGL-16型冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.4 造模方法

36只BALB/c雌性小鼠每笼随机抓取3只分配至12笼,应用WPS Office 2021软件表格中的RANDARRAY公式生成对应的12个随机数按大小排序,笼号排序1~9为造模组27只、10~12为正常对照组9只,称量后各组体重均衡。根据本课题组改良的一次免疫法进行造模^[11]:造模组小鼠给Ad-TSHR289腺病毒溶液胫前肌肉注射,每只小鼠注射剂量为100 μ l(含腺病毒 2.0×10^9 PFU/ml)进行免疫。正常对照组小鼠注射PBS缓冲液100 μ l/只。

于免疫4周后,应用随机数字选取造模组6只、正常对照组3只颌下静脉取血约100 μ l,室温静置1 h,27℃、3000 r/min(半径13.5 cm)离心5 min取血清。检测血清T3含量,根据既往研究^[12],造模组小鼠血清T3水平高于正常对照组测定值的 $\bar{x}+3s$ 作为成模标志。

1.5 动物分组及干预方法

将造模成功小鼠应用随机数字分为模型组、甲巯咪唑组、化痰散结组各9只。造模后第9周开始甲巯咪唑组小鼠给予甲巯咪唑片5.2 mg/(kg·d)灌胃,相当于成人每日给药量40 mg;化痰散结组小鼠给予化痰散结方相对生药量7.02 g/(kg·d)灌胃,给药量均相当于成人每日临床给药量同剂量,按人与实验动物的体表面积折算法进行等效比换算^[13];正常对照组与模型组给予纯水0.1 ml/10 g体质量灌胃。均每日灌胃1次,共计4周。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 甲状腺功能及TRA b检测 取材前称取小鼠体质量,2%异氟烷(0.41 ml/min)气雾麻醉后摘眼球取血,脱臼处死,全血置于促凝管中,27℃、

3000 r/min 离心（半径 13.5 cm）8 min 取血清，以放射免疫法检测 T4 及 TRAb 水平，步骤按照试剂盒要求操作。

1.6.2 甲状腺组织形态大体观察及病理学检测
由于小鼠甲状腺组织过小，每组采用随机数字选取 5 只剥离甲状腺，置于组织固定液。固定 2 h 后取出，观察比较各组小鼠甲状腺大小和形态并拍照。固定 24 h 后，石蜡包埋后进行切片（3 μm 厚）。HE 染色，脱水封片，显微镜下观察，采集图像进行分析。

1.6.3 甲状腺微血管 CD34 免疫组化染色及微血管密度（MVD）计数
甲状腺石蜡切片以 CD34 免疫组化染色标记微血管。在显微镜下对 CD34 阳性染色微血管进行计数，判定标准^[14]为：CD34 的阳性染色均为棕（黄）色，在血管内皮细胞质中表达，任何阳性染色的单个内皮细胞或细胞团，都认为是一个可计数的微血管。每一个标本先在低倍镜下（×100）选 3 个微血管数量最多的“热点”区域，在高倍镜下（×400）计数每一个区域中的微血管数，取其平均值为 MVD 计数。

1.6.4 甲状腺中 VEGFA、VEGFR2 的蛋白表达检测
各组剩余 4 只小鼠剥离甲状腺后于 -80 ℃ 冷冻保存，进行蛋白表达检测。提取甲状腺组织总蛋白，测定样品蛋白浓度，Western Blot 法检测 VEGFA、VEGFR2 的蛋白表达：SDS-PAGE 电泳，每个样品总蛋白上样量均为 40 μg，转膜，封闭，抗体 4 ℃ 孵育过夜，β-actin、VEGFA、VEGFR2 稀释比例分别为 1：6000、1：2000、1：200，二抗室温孵育 30 min，滴加新鲜配制的 ECL 溶液后暗室中曝光，将胶片进行扫描，Image J 1.53k 软件分析目标带的光密度值。

1.7 统计学方法

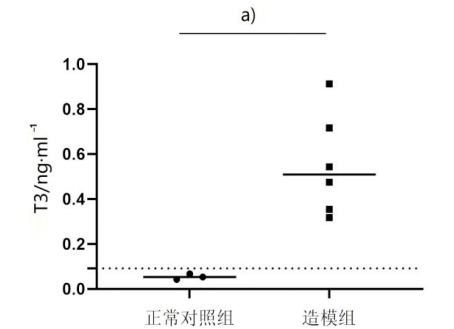
采用 Graphpad Prism 9.0 进行数据分析与制图。计量资料均符合正态分布，采用均值±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，两组比较采用 *t* 检验，多组样本方差不齐的采用单因素方差分析，多组间两两比较用 Tukey's 多重比较，方差不齐时采用 Welch's 校正。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模组和正常对照组小鼠免疫 4 周后血清 T3 水平比较

图 1 示，造模组 6 只小鼠血清 T3 水平显著高于正常对照组的 $\bar{x} + 3s$ ，差异有统计学意义（*P* <

0.01），成模率 100%。



注：T3，三碘甲状腺原氨酸；虚线为正常对照组的 $\bar{x} + 3s$ 。a) 与正常对照组比较，*P* < 0.01。

图 1 造模组和正常对照组小鼠免疫 4 周后血清 T3 水平比较

Figure 1 Comparison of serum T3 levels between the model group and the normal control group four weeks after immunization

2.2 各组小鼠血清 T4 及 TRAb 水平比较

表 1 示，各组小鼠血清 T4、TRAb 水平总体比较，差异均有统计学意义（*P* < 0.01）。组间两两比较：与正常对照组比较，模型组小鼠血清中 T4、TRAb 水平明显升高（*P* < 0.01）；与模型组比较，甲巯咪唑组和化痰散结组血清中 T4、TRAb 水平明显降低（*P* < 0.01）；甲巯咪唑组和化痰散结组血清 T4、TRAb 水平差异无统计学意义（*P* > 0.05）。

表 1 各组小鼠血清 T4、TRAb 水平比较
Table 1 Comparison of serum T4 and TRAb levels in each group of mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	T4/ng·ml ⁻¹	TRAb/U·L ⁻¹
正常对照组	9	41.83±10.25	0.44±0.27
模型组	9	81.71±13.02 ^{a)}	17.91±7.19 ^{a)}
甲巯咪唑组	9	57.57±11.43 ^{b)}	9.68±5.17 ^{b)}
化痰散结组	9	63.05±8.84 ^{b)}	7.27±3.75 ^{b)}
<i>F</i> 值		20.17	16.95
<i>P</i> 值		< 0.001	< 0.001

注：T4，甲状腺素；TRAb，促甲状腺素受体自身抗体。
a) 与正常对照组比较，*P* < 0.01；b) 与模型组比较，*P* < 0.01。

2.3 各组小鼠甲状腺组织形态大体观察及病理学结果

图 2 示，与正常对照组比较，模型组小鼠的甲状腺体积明显增大，颜色深红，存在过度充血；与模型组比较，甲巯咪唑组和化痰散结组小鼠的甲状腺明显减小，颜色变浅，充血情况有所改善。化痰散结组较甲巯咪唑组甲状腺体积略小、充血略浅，差异不显著。

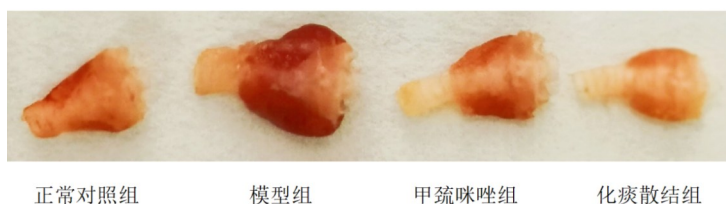


图2 各组小鼠甲状腺大体外观比较

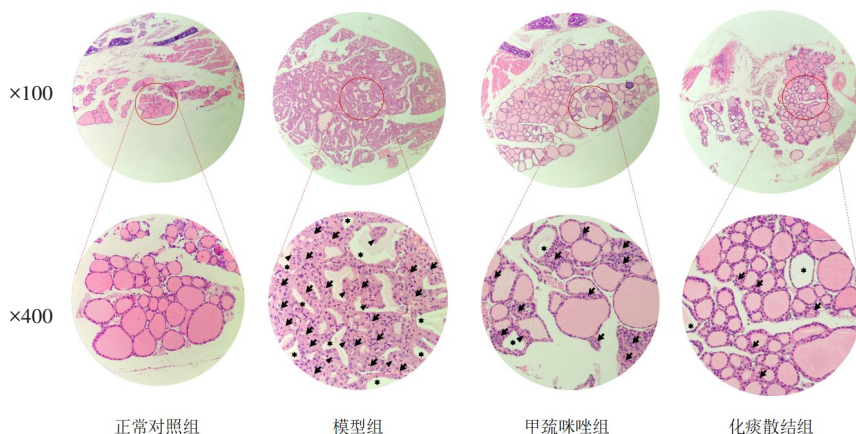
Figure 2 Comparison of the appearance of the thyroid gland in each group of mice

HE 染色结果 (图3) 示, 正常对照组甲状腺滤泡上皮细胞呈扁平状、排列整齐、边缘光滑、腔内充盈。模型组甲状腺滤泡增生显著, 上皮细胞呈柱状且增殖明显, 滤泡体积增大、呈多层上皮、边缘粗糙、呈不规则型内凸, 滤泡腔内物质欠充盈、存在区域融合。甲巯咪唑组和化痰散结组甲状腺滤泡增生和上皮细胞增殖减轻, 滤泡边缘光滑、内凸明显减少, 滤泡腔内充盈恢复。甲巯咪唑组和化痰散结组甲状腺组织形态均有明显恢复, 其中化痰散结组形态恢复更显著。

2.4 各组小鼠甲状腺微血管 CD34 免疫组化染色结果

图4示, 正常对照组甲状腺滤泡形态规则, 微

血管呈单层上皮沿滤泡边缘分布, 说明甲状腺内微血管形成网络包裹于滤泡表面, 血管内无明显红细胞残留。模型组甲状腺滤泡边缘不规则, 微血管随内凸的滤泡细胞向腔内凸起, 滤泡间质内可见较多小血管, 管腔增宽, 血管内见较多红细胞残留。药物治疗干预后, 甲巯咪唑组滤泡形态有较大恢复, 微血管内凸减少, 滤泡间质小血管减少, 管腔有所缩小, 小血管内红细胞残留减少。化痰散结组甲状腺滤泡形态显著恢复, 微血管内凸减少, 滤泡间质内小血管明显减少, 管腔明显缩小, 血管内红细胞残留极少。与甲巯咪唑组相比, 化痰散结组对甲状腺滤泡形态及微血管增生的恢复略显著。



注: 图中黑色箭头指示为增殖的多层滤泡上皮, 部分存在区域融合; 三角号指示为滤泡上皮内凸至滤泡腔; 星号指示为滤泡腔内物质欠充盈。

图3 各组小鼠甲状腺组织 HE 染色结果比较

Figure 3 Comparison of HE staining of thyroid tissue of mice in each group

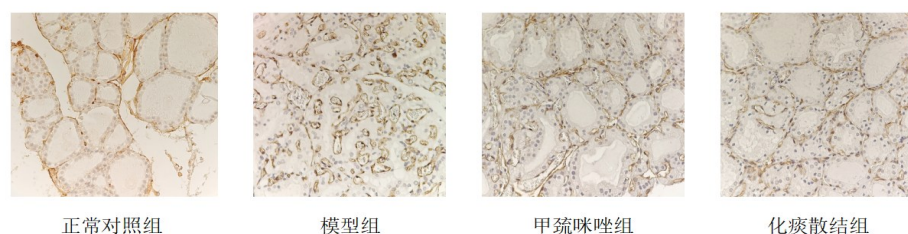


图4 各组小鼠甲状腺微血管 CD34 免疫组化染色结果比较 (×200)

Figure 4 Immunohistochemical staining of thyroid microvessels CD34 in each group of mice

2.5 各组小鼠甲状腺MVD计数比较

正常对照组小鼠甲状腺MVD计数为(55.80±14.45)个,模型组为(183.60±28.02)个,甲疏咪唑组为(108.40±18.41)个,化痰散结组为(111.20±23.24)个。各组整体比较差异有统计学意义($F=29.43, P<0.0001$)。组间两两比较:与正常对照组比较,模型组小鼠MVD计数明显增加($P<0.0001$);与模型组比较,甲疏咪唑组和化痰散结组MVD计数明显减少($P=0.0003, P=0.0004$);甲疏咪唑组和化痰散结组两组间比较差异无统计学意义($P=0.9968$)。

2.6 各组小鼠甲状腺VEGFA、VEGFR2蛋白表达比较

表2示,各组小鼠甲状腺VEGFA、VEGFR2蛋白表达总体比较,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。组间两两比较:与正常对照组比较,模型组小鼠甲状腺VEGFA、VEGFR2蛋白表达上调($P<0.01$);与模型组比较,甲疏咪唑组与化痰散结组VEGFA、VEGFR2蛋白表达下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。甲疏咪唑组与化痰散结组两组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。各组小鼠甲状腺VEGFA、VEGFR2蛋白电泳图见图5。

表2 各组小鼠甲状腺VEGFA、VEGFR2蛋白表达比较
Table 2 Comparison of thyroid VEGFA and VEGFR2 protein expression in each group of mice ($\bar{x}\pm s$)

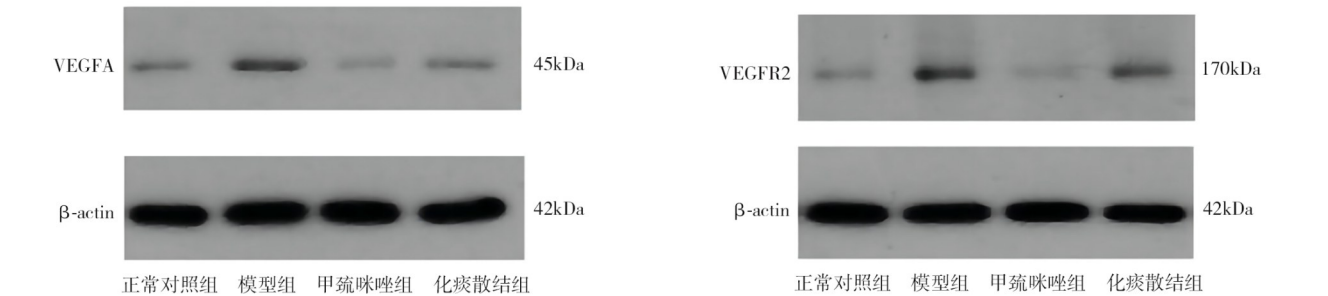
组别	鼠数	VEGFA	VEGFR2
正常对照组	3	0.23±0.07	0.13±0.05
模型组	3	0.71±0.20 ^{a)}	0.62±0.15 ^{a)}
甲疏咪唑组	3	0.29±0.23 ^{b)}	0.12±0.06 ^{c)}
化痰散结组	3	0.35±0.12 ^{b)}	0.36±0.05 ^{c)}
<i>F</i> 值		10.89	5.677
<i>P</i> 值		0.002	0.022

注:VEGFA,血管内皮生长因子A;VEGFR2,血管内皮生长因子受体。
a)与正常对照组比较, $P<0.01$;b)与模型组比较, $P<0.01$;c)与模型组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

甲状腺是高度血管化的内分泌器官,密集的毛细血管网围绕着每个甲状腺滤泡,滤泡细胞和毛细血管之间的双向交换对于甲状腺功能至关重要^[14]。GD发病时的甲状腺高血管化是一个重要的超声特征,甲状腺血管化与甲状腺体积直接相关,并且较大的甲状腺往往血管化程度更高,更高的血管化程度与显著的低回声以及更高的血清游离甲状腺素和TRAb水平相关,甲状腺血管化程度可以作为GD复发的预测指标^[15]。临床观察^[14]发现,部分GD患者在发病早期可仅见甲状腺内血流信号丰富,而甲状腺体积正常,表明在甲状腺肿大的形成过程中血管新生早于甲状腺细胞增生。因此,甲状腺血管新生是形成甲状腺肿大和功能亢进的重要环节。VEGF是最强效的血管生成因子^[16],而VEGFA是促血管生成作用最强的亚型,在甲状腺中表达量较高,通过与内皮细胞膜上的VEGFR2结合,可直接促进内皮细胞的增殖,并增加血管的通透性,同时促进内皮细胞迁移,促进血管形成^[17]。研究表明,GD患者甲状腺组织和血清中的VEGFA表达显著升高^[18]。在体外模型中,以GD患者血清粗提的IgG刺激人甲状腺细胞可以诱导VEGF产生增多^[19]。本研究也证实了GD模型小鼠的甲状腺中存在大量血管新生,形态结构紊乱。

GD患者的甲状腺以弥漫性肿大为主,质地多软而不坚,中医学认为其以“痰”为主要病理因素。多数患者经过治疗后甲状腺肿大的状态仍持久不消,说明“痰”的病理因素可长期存在^[5]。血中津液可以溢出脉外化为组织内之津液,GD发生时津液经“火”之凝炼可变为“痰”。化痰散结方中夏枯草味苦性辛,入肝经,具有较好散结泄热之功,《神农本草经》记载其可“散癭结气”。玄参味咸性寒,《名医别录》记载其可:“下水,止烦渴,



注:VEGFA,血管内皮生长因子A;VEGFR2,血管内皮生长因子受体。

图5 各组小鼠甲状腺VEGFA、VEGFR2表达电泳图

Figure 5 Electrophoresis of VEGFA and VEGFR2 expression in the thyroid gland of mice in each group

散颈下核”，《本草正》记载其可“退无根浮游之火，散周身癰结热痛”，同样擅清热散结。《本草征要》谓土贝母可“散结消肿，软坚解毒”，《本草汇言》云：“贝母，开郁下气，化痰之药也……解痼毒，破癰结，消实痰，敷恶疮，又以土者为佳”。全方可清肝泻火、化痰散结，配伍精当，切中GD病机。

动物模型的构建一直是GD研究的难点，目前最成功的方法是通过在BALB/c小鼠中注射cDNA质粒或腺病毒将人TSHR细胞外域引入体内^[20]。本课题组在前期研究中成功构建了以过表达人TSHR-A亚单位的重组腺病毒诱导的GD小鼠模型^[12]，在本实验中对鉴定成模方法进行了改进，不须处死小鼠、操作简便易行，鉴定结果显示小鼠免疫4周后成模率达100%。GD模型小鼠的甲状腺体积明显增大，颜色明显变深、呈深红色，存在过度充血的表现；病理结果显示甲状腺滤泡显著增生、组织形态明显改变；血清T4和TRAb水平显著升高；甲状腺微血管密度显著增加，微血管随内凸的滤泡上皮细胞而向滤泡腔内凸起，滤泡间质内可见较多小血管；甲状腺中VEGFA和VEGFR2的蛋白表达显著升高。与既往普遍采用口服左旋甲状腺素诱导大鼠甲状腺功能亢进或口服甲硫咪唑诱导大鼠甲状腺肿大的动物模型不同^[2, 14]，本研究诱导模型小鼠产生高水平的TRAb，从而引起甲状腺功能亢进和滤泡增生的病理改变，其发病机制和病理表现均与临床更为接近。本研究首次证实在免疫诱导的GD小鼠模型中存在大量甲状腺血管新生，而VEGFA/VEGFR2的旁分泌作用显著升高可能是其主要发病机制。

本研究采用国际指南中推荐临床首选的甲硫咪唑作为阳性对照药物。在用药干预后，甲硫咪唑组和化痰散结组小鼠的T4、TRAb水平和甲状腺组织形态均有显著恢复。与甲硫咪唑组相比，化痰散结组对甲状腺组织形态和滤泡细胞增殖的改善更加明显。两组小鼠甲状腺中血管新生和形态结构的改变均有显著改善，VEGFA和VEGFR2蛋白表达均显著降低，两组间无显著差异。因此，降低VEGF表达、抑制甲状腺血管新生可能是化痰散结方改善GD甲状腺肿大的重要作用机制之一。本团队既往研究^[21]发现，化痰散结法对甲状腺肿大的改善显著优于甲硫咪唑，而降低TRAb的程度与甲硫咪唑无差异，与本研究结果略有差异，其原因可能有以下2点：1) 给药剂量不同，本研究甲硫咪唑给药剂量为5.2 mg/(kg·d)，相当于人初始治疗最大剂量40 mg/d，而既往研究给药剂量相当于人最大日

给药量60 mg/d；2) 干预节点和时间不同，本研究于免疫后第9周开始给药，开始干预时的甲状腺肿大程度较重，干预周期为4周，疗程更短。

综上所述，化痰散结方能抑制GD模型小鼠甲状腺血管新生，并改善血管功能，可能是通过下调甲状腺VEGFA/VEGFR2信号实现的。本研究初步揭示了化痰散结方抑制GD甲状腺血管新生的作用机制，但对作用机制的研究尚浅，后续还需要进行体外实验、基因敲除等进一步验证，并对上游调控机制进行深入的探索。

参考文献

- [1] LANE LC, CHEETHAM TD, PERROS P, et al. New therapeutic horizons for Graves' hyperthyroidism [J]. Endocr Rev, 2020, 41(6): 873-884.
- [2] JANG JY, CHOI SY, PARK I, et al. VEGFR2 but not VEGFR3 governs integrity and remodeling of thyroid angio-follicular unit in normal state and during goitrogenesis [J]. EMBO Mol Med, 2017, 9(6): 750-769.
- [3] 《中成药治疗优势病种临床应用指南》标准化项目组. 中成药辅助治疗甲状腺功能亢进症(Graves病)临床应用指南(2021年)[J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(9): 1029-1039.
- [4] 于雪婷, 汤阳, 王文方, 等. 甲状腺肿大与“气、痰、瘀”的关系论述及临床思考[J]. 中医药导报, 2018, 24(21): 18-20.
- [5] 马文欣, 刘金民, 汤阳, 等. 从抑制血管新生探讨中医治疗Graves病的调血脉之法[J]. 中医杂志, 2021, 62(14): 1224-1227.
- [6] 孟祥. 甲亢宁胶囊对Graves病减毒增效作用的临床观察[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [7] 石霞, 朱晓云, 刘喜明. 近5年毒性弥漫性甲状腺肿中医病机及辨证论治研究概述[J]. 环球中医药, 2020, 13(6): 1119-1124.
- [8] 夏枯草口服液临床应用共识专家组. 夏枯草口服液治疗甲状腺肿大/结节类甲状腺疾病临床应用专家共识[J]. 中草药, 2020, 51(8): 2082-2087.
- [9] 袁泉. 化痰散结法干预Graves病小鼠甲状腺肿大与功能亢进的免疫调控研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [10] 朱晓云, 刘丽娟, 杨东甲, 等. 过表达人TSHR-A亚单位的重组腺病毒Ad-TSHR289/6xHis载体构建与鉴定[J]. 重庆医科大学学报, 2014, 39(4): 524-528.
- [11] TANG Y, ZHU X, FENG H, et al. An improved mouse model of Graves disease by once immunization with Ad-TSHR289[J]. Endocr J, 2019, 66(9): 827-835.
- [12] 汤阳, 朱晓云, 冯慧, 等. 重组腺病毒Ad-TSHR289注射诱导Graves病小鼠模型[J]. 山东医药, 2019, 59(6): 49-52.

- [13]魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1698.
- [14]COLIN IM, DENEJF JF, LENGELÉ B, et al. Recent insights into the cell biology of thyroid angiofollicular units [J]. *Endocr Rev*, 2013, 34(2): 209–238.
- [15]VITA R, DI BARI F, PERELLI S, et al. Thyroid vascularization is an important ultrasonographic parameter in untreated Graves' disease patients [J]. *J Clin Transl Endocrinol*, 2019, 15: 65–69. doi: 10.1016/j.jcte. 2019. 01. 001.
- [16]FERRARA N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2009, 20(4): 158–163.
- [17]卢文丽, 方肇勤, 潘志强, 等. 基于芯片数据分析同病异证 H22 荷瘤小鼠甲状腺生长因子表达特征[J]. *南京中医药大学学报*, 2012, 28(2): 147–151.
- [18]MALKOMES P, OPPERMANN E, BECHSTEIN WO, et al. Vascular endothelial growth factor: marker for proliferation in thyroid diseases? [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2013, 121(1): 6–13.
- [19]SATO K, YAMAZAKI K, SHIZUME K, et al. Stimulation by thyroid-stimulating hormone and Grave's immunoglobulin G of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human thyroid follicles in vitro and flt mRNA expression in the rat thyroid in vivo [J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(3): 1295–1302.
- [20]冒婧敬, 相萍萍, 刘超. Graves 病动物模型构建的研究进展[J]. *实用临床医药杂志*, 2021, 25(9): 113–116, 122.
- [21]汤阳. 化痰散结法干预 Graves 病小鼠免疫耐受及其调控失常的作用机制研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2019.

Effect of *Huatan Sanjie Formula* (化痰散结方) on Thyroid Angiogenesis and VEGFA/VEGFR2 Signaling Pathway in Graves' Disease Model Mice

MA Wenxin^{1,2}, ZHU Xiaoyun², WANG Chengna¹, XU Jing³, LIU Ximing², TANG Yang¹

1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029; 2. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences; 3. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of *Huatan Sanjie Formula* (化痰散结方, HSF) in treating Graves' disease (GD) from the perspective of thyroid angiogenesis. **Methods** Thirty-six BALB/c female mice were randomly divided into a normal control group (n=9) and a modeling group (n=27). Mice in the modeling group were injected with 2.0×10^9 PFU/ml of Ad-TSHR289 adenovirus into the tibialis anterior muscle to build GD model. Nine weeks after immunization, the successfully modeled mice were randomly divided into model group, methimazole (MMI) group and HSF group, with 9 mice in each group. The MMI group was given 5.2 mg/(kg·d) of methimazole tablets by gavage, while the HSF group was given HSF at a relative crude drug dosage of 7.02 g/(kg·d) by gavage. The normal control group and the model group were given 0.1 ml/10 g of pure water by gavage. All groups were administered intragastrically once a day for a total of 4 weeks. The levels of thyroxine (T4) and thyrotropin receptor autoantibodies (TRAb) in serum were detected by radioimmunoassay, while the pathological changes of the thyroid gland were assessed by HE staining. The vascular morphology of thyroid tissue was observed by CD34 immunohistochemical staining, and the microvessel density (MVD) was counted. The protein expression of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) in thyroid was detected by Western-blot. **Results** Compared to those in the normal control group, the thyroid volume of the mice in the model group significantly increased with excessive congestion, and the pathology showed significant thyroid follicular hyperplasia, columnar and proliferated epithelial cells, and enlarged follicle size; serum T4 and TRAb significantly increased, as well as the count of thyroid MVD, and the protein expressions of thyroid VEGFA and VEGFR2 ($P < 0.01$). Compared to those in the model group, the thyroid glands of the mice in the MMI group and the HSF group were significantly reduced, and the congestion was improved; pathology showed that thyroid follicular hyperplasia and epithelial cell proliferation were reduced, with smooth edges of the follicles and the significantly reduced inward protrusion; serum T4 and TRAb significantly decreased, as well as the thyroid MVD, thyroid VEGFA and VEGFR2 protein expressions ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There was no significant difference in all indicators between the MMI group and the HSF group ($P > 0.05$). **Conclusion** HSF may inhibit thyroid angiogenesis by down-regulating thyroid VEGFA/VEGFR2 signaling pathway, thereby improving goitre and hyperfunction in GD mice.

Keywords Graves disease; thyroid; angiogenesis; vascular endothelial growth factor; *Huatan Sanjie Formula* (化痰散结方)

(收稿日期: 2024-03-09; 修回日期: 2024-07-18)

[编辑: 邓媛]