

海藻-甘草含药血清对 M22 诱导的 Nthy-ori-3-1 细胞增殖的作用研究

任彧娜, 刘晓庆, 曹 灿, 李慕云, 廖文勇, 张淑静, 于 雪, 范盎然, 修琳琳*, 钟赣生*

北京中医药大学, 北京 100029

摘 要: **目的** 探讨海藻-甘草含药血清对人甲状腺正常细胞 Nthy-ori-3-1 增殖的作用, 为进一步研究海藻与甘草配伍抗甲状腺肿大的作用机制奠定基础。**方法** 体外培养 Nthy-ori-3-1 细胞, 使用不同浓度的促甲状腺激素受体人单克隆抗体 M22 作用于 Nthy-ori-3-1 细胞不同时间, 观察 M22 作用的最佳浓度及时间。制备海藻-甘草含药血清, M22 刺激细胞 24 h 后, 分别给予 5%、10%、15%、20%海藻-甘草含药血清干预 24 h, 采用 CCK-8 法检测各组细胞增殖情况。流式细胞术检测细胞周期分布和凋亡情况; 透射电镜观察细胞形态; 免疫荧光检测微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein light chain3, LC3) 表达情况; Western blotting 检测 Beclin1 蛋白表达。**结果** M22 明显刺激 Nthy-ori-3-1 细胞增殖, 0.125 $\mu\text{g/mL}$ 的 M22 作用 24 h 时促增殖作用最佳 ($P < 0.01$)。经海藻-甘草含药血清干预后, 细胞增殖明显抑制 ($P < 0.05$ 、 0.01), 细胞呈现明显的凋亡形态学变化, G_0/G_1 期细胞比例明显升高 ($P < 0.01$), G_2/M 期细胞比例无显著性差异, 细胞凋亡率明显上升 ($P < 0.01$), LC3 平均荧光强度增加, Beclin1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$)。**结论** M22 可刺激 Nthy-ori-3-1 细胞增殖, 海藻-甘草含药血清抑制 M22 诱导的 Nthy-ori-3-1 细胞增殖, 促进其凋亡, 可能通过调节自噬来发挥抑制 Nthy-ori-3-1 细胞增殖的作用, 以达到抗甲状腺肿大的疗效。

关键词: 海藻-甘草含药血清; 甲状腺肿大; Nthy-ori-3-1 细胞; 细胞自噬; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253 - 2670(2024)02 - 0527 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.02.018

Effect of *Sargassum-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* containing serum on proliferation of M22-induced Nthy-ori-3-1 cells

REN Yuna, LIU Xiaoqing, CAO Can, LI Muyun, LIAO Wenyong, ZHANG Shujing, YU Xue, FAN Angran, XIU Linlin, ZHONG Gansheng

Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Haizao (*Sargassum*)-Gancao (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*) containing serum on proliferation of human thyroid cells Nthy-ori-3-1, and lay a foundation for further research on the anti-goiter mechanism of *Sargassum-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* combination. **Methods** Nthy-ori-3-1 cells were cultured *in vitro*, different concentrations of thyroid stimulating hormone receptor human monoclonal antibody M22 were used to act on Nthy-ori-3-1 cells at different times, and the optimal concentration and time of M22 were observed. *Sargassum-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* containing serum were prepared, after cells were stimulated by M22 for 24 h, 5%, 10%, 15% and 20% *Sargassum-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* containing serum were given for intervention for 24 h. CCK-8 method was used to detect cell proliferation in each group. The cell cycle distribution and apoptosis of each group were detected by flow cytometry; Cells morphology was observed by transmission electron microscopy; The expression of microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) was detected by immunofluorescence; The expression of Beclin1 protein was detected by Western blotting. **Results** M22 significantly stimulated the proliferation of Nthy-ori-3-1 cells, and the proliferation was best at 0.125 $\mu\text{g/mL}$ concentration of M22 for 24 h ($P < 0.01$). After intervention with *Sargassum-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* containing serum, cell proliferation was significantly inhibited ($P < 0.05$, 0.01), cells showed obvious morphological changes of apoptosis, and the proportion of G_0/G_1 phase cells was significantly increased ($P < 0.01$), there was no significant difference in the proportion of G_2/M phase cells, and the

收稿日期: 2023-06-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82104411)

作者简介: 任彧娜, 女, 硕士研究生, 从事中药药性理论研究。E-mail: 15735641326@163.com

*通信作者: 修琳琳, 博士, 讲师, 从事中药药性理论研究。E-mail: xiulinlin1231@126.com

钟赣生, 硕士, 教授, 博士生导师, 从事中药药性理论研究。E-mail: zhonggansheng@sohu.com

apoptosis rate was significantly increased ($P < 0.01$), the mean fluorescence intensity of LC3 was increased, Beclin1 protein expression level was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** M22 can stimulate the proliferation of Nthy-ori-3-1 cells, *Sargassum-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* containing serum can inhibit the proliferation of M22-induced Nthy-ori-3-1 cells and promote apoptosis, which may play a role on inhibiting the proliferation of Nthy-ori-3-1 cells by regulating autophagy, so as to achieve the effect of anti-goiter.

Key words: *Sargassum-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* containing serum; goiter; Nthy-ori-3-1 cells; cell autophagy; cell apoptosis

海藻与甘草属于“十八反”禁忌, 历代关于其能否同服的争议颇多^[1]。临床中海藻-甘草配伍组合常用于治疗甲状腺疾病, 如明代王肯堂《证治准绳》中记载的昆布散可治疗瘰癧, 明代陈实功《外科正宗》中首载的海藻玉壶汤常用于治疗瘰癧、瘰癧, 清代顾世澄《疡医大全》中的消痰汤可用于治疗瘰癧、瘰癧, 以上组方均含海藻-甘草配伍且能取得良好疗效^[2-3]。关于海藻-甘草反药组合有大量实验研究, 其可行性及科学性目前正在被现代科学逐步验证和阐释^[4-5]。甲状腺肿大是一种常见的内分泌系统疾病, 中医学称甲状腺肿大为“瘰癧”, 情志郁结、饮食不节、地域差异及体质因素等均可导致脏腑经络失和, 气、痰、血壅结形成瘰癧^[6-8]。西医学则认为引起甲状腺功能异常的有诸多因素, 如碘摄入不足或摄入过量、自身免疫系统紊乱等, 导致甲状腺上皮细胞增生, 从而形成甲状腺肿大^[9]。在甲状腺肿大的形成过程中, 伴随着甲状腺组织的增生和细胞的增殖, 细胞凋亡与增殖失衡, 凋亡相对不足^[10]。

近年来, 关于海藻与甘草配伍作用机制的研究较多, 但多为包含海藻、甘草的全方, 较少直接探讨海藻-甘草对甲状腺肿大的作用^[11]。本研究以人甲状腺正常细胞 Nthy-ori-3-1 为研究对象, 选取前期实验效果最佳剂量即《中国药典》2020 年版高限剂量的 2 倍(海藻 24 g、甘草 20 g)制备含药血清^[12-13], 通过观察海藻-甘草含药血清对 Nthy-ori-3-1 细胞增殖模型的影响, 探讨其抗甲状腺肿大的可能作用机制, 为海藻-甘草作为可靠的临床用药提供依据。

1 材料

1.1 动物与细胞

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 30 只, 10 周龄, 体质量 300~340 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 质量合格证号 SCXK(京)2021-0011, 使用许可证号 SYXK(京)2020-0033。动物饲养于北京中医药大学 SPF 级动物房, 室内温度(22±2)℃, 相对湿度 60%~70%。动物实验经北京中医药大学动物伦理委员会批准(批准号 BUCM-4-2021072001-3037)。

Nthy-ori-3-1 细胞购自商城北纳创联生物科技

有限公司, 细胞编号 340487。

1.2 药品与试剂

海藻配方颗粒(批号 21061391)、甘草配方颗粒(批号 21070231)购自江阴天江药业有限公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 批号 2350404RP)、青链霉素混合液(批号 187689)购自美国 Invitrogen 公司; 含 EDTA 的胰酶(批号 2323143)购自美国 Gibco 公司; CCK-8 试剂(批号 AQ308-500T)、RPMI 1640 培养基(批号 10752109088)购自北京翱擎生物科技有限公司; 促甲状腺激素受体人单克隆抗体 M22(批号 m22-11ar)购自英国 RSR 公司; 电镜固定液(批号 CR2305008)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA, 批号 CR2209008)、DAPI 染色试剂(批号 CR2302026)、CY3 标记山羊抗兔 IgG 抗体(批号 CR2203118)购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 812 包埋剂(批号 CR2304084)购自美国 SPI 公司; 细胞周期检测试剂盒(批号 20220822)、BCA 蛋白含量检测试剂盒(批号 20200720)购自凯基生物技术股份有限公司; 细胞凋亡检测试剂盒(批号 20010370)、β-actin 小鼠单克隆抗体(批号 10025459)、微管相关蛋白轻链 3(microtubule-associated protein light chain3, LC3)多克隆抗体(批号 00115896)、Beclin1 多克隆抗体(批号 00106238)购自美国 Proteintech 公司。

1.3 仪器

Heracell Vios 160i 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); OptiMair 型超净工作台(新加坡 ESCO 公司); 5702R 型台式低温离心机(德国 Eppendorf 公司); CPOCH 型全波长酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); Echo Revolve 型正倒置一体荧光显微镜(美国 Echo 公司); HT7800 型透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司); FACSCelesta 三激光流式细胞仪(美国 BD 公司); GS-900™ Calibrated Densitometry System 型凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 海藻-甘草含药血清的制备

30 只 SPF 级雄性 Wistar 大鼠适应性喂养 3 d

后,随机分为对照组和海藻-甘草组。按前期实验基础选择海藻、甘草生药剂量为《中国药典》2020 年版高限剂量的 2 倍(海藻 24 g、甘草 20 g)^[12-13],即 7.92 g/kg,将海藻和甘草配方颗粒用去离子水混匀配制成混悬液,每日 ig 2 次。对照组 ig 等体积去离子水,2 次/d,连续 5 d。于末次给药 1 h 后麻醉,腹主动脉取血,于 4 °C 冰箱中静置 2 h,待其自然凝血,取上清液,2 500 r/min 离心 15 min,取血清,于 56 °C 水浴 30 min 灭活,用 0.22 μm 微孔滤器滤过除菌,分装于 15 mL 离心管中,保存于-80 °C 冰箱备用。

2.2 细胞培养

Nthy-ori-3-1 细胞用含 10% 胎牛血清、100 μg/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基,常规培养于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱,饱和湿度,严格无菌,每 2~3 天用 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞并传代,取对数生长期细胞用于实验。

2.3 CCK-8 法检测 Nthy-ori-3-1 细胞增殖

2.3.1 M22 对 Nthy-ori-3-1 细胞增殖的影响 取对数生长期的 Nthy-ori-3-1 细胞,以 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板,每孔 100 μL,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,待细胞贴壁后,分别加入不同质量浓度(0.062 5、0.125 0、0.250 0、0.500 0、1.000 0 μg/mL)的 M22,对照组加入等体积 PBS,每组设 3 个复孔。在 37 °C、5% CO₂ 条件下,分别作用细胞 12、24、48 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,继续培养 1 h,用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(A)值。

2.3.2 海藻-甘草含药血清对 Nthy-ori-3-1 细胞活性影响 取对数生长期的 Nthy-ori-3-1 细胞,以 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板,每孔 100 μL,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,待细胞贴壁后,设置对照组、模型组和海藻-甘草含药血清组,模型组给予 0.125 μg/mL M22 培养 24 h,对照组给予等体积 PBS;海藻-甘草含药血清组在模型建立的基础上,分别加入 5%、10%、15%、20% 海藻-甘草含药血清,每组设 3 个复孔。37 °C、5% CO₂ 条件下,作用细胞 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,继续培养 1 h,用酶标仪测定 450 nm 处的 A 值。

2.4 倒置相差显微镜观察 Nthy-ori-3-1 细胞形态

取对数生长期的 Nthy-ori-3-1 细胞,以 2×10^5 个/mL 接种于 6 孔板,每孔 2 mL,待细胞贴壁后,设置对照组、模型组和海藻-甘草含药血清组,模型

组给予 0.125 μg/mL M22 培养 24 h,对照组给予等体积 PBS,海藻-甘草组在模型建立的基础上,加入 15% 海藻-甘草含药血清,每组设 3 个复孔。37 °C、5% CO₂ 条件下,作用细胞 24 h 后,倒置相差显微镜观察各组细胞形态变化。

2.5 透射电镜观察 Nthy-ori-3-1 细胞形态

细胞接种、分组及药物处理方法同“2.4”项,药物作用 Nthy-ori-3-1 细胞 24 h 后,离心收集细胞,加入电镜固定液于 4 °C 固定 4 h,加入 1% 锇酸固定 2 h,依次乙醇、丙酮脱水,渗透包埋,将树脂块于超薄切片机超薄切片 60~80 nm,经醋酸铀饱和乙醇溶液避光染色 8 min 和避二氧化碳染色 8 min,室温干燥过夜。于透射电子显微镜下观察,采集图像分析。

2.6 流式细胞术检测 Nthy-ori-3-1 细胞周期分布

细胞接种、分组及药物处理方法同“2.4”项,每组设 3 个复孔。37 °C、5% CO₂ 条件下,药物作用 Nthy-ori-3-1 细胞 24 h 后,制备细胞密度为 1×10^6 个/mL 细胞悬液,加入 70% 冷乙醇固定,按 Rnase A-PI (1:9) 配制染色工作液,避光染色 60 min 后 200 目筛网滤过,于流式细胞仪记录激发波长 488 nm 处红色荧光。

2.7 流式细胞术检测 Nthy-ori-3-1 细胞凋亡

细胞接种、分组及药物处理方法同“2.4”项,每组设 3 个复孔。37 °C、5% CO₂ 条件下,药物作用 Nthy-ori-3-1 细胞 24 h 后,制备细胞密度为 1×10^6 个/mL 细胞悬液,加入 CL488-Annexin V 和 PI 工作液,避光,4 °C 染色 15 min 后 200 目筛网滤过,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.8 免疫荧光检测 LC3 平均荧光强度

细胞接种、分组及药物处理方法同“2.4”项,每组设 3 个复孔,药物作用 24 h 后,将爬片甩干,用组化笔在盖玻片细胞均匀分布处画圈。在圈内加 100 μL 破膜工作液,室温孵育 20 min,再滴加 3% BSA 均匀覆盖组织,室温封闭 30 min,一抗 4 °C 孵育过夜,二抗室温孵育 50 min,滴加 DAPI 染液后,用抗荧光淬灭封片剂封片,进行图像采集。

2.9 Western blotting 检测 Beclin1 蛋白表达

细胞接种、分组及药物处理方法同“2.4”项,每组设 3 个复孔。37 °C、5% CO₂ 条件下,药物作用 Nthy-ori-3-1 细胞 24 h 后,弃去培养基,加入 RIPA 裂解液,于冰上裂解细胞 30 min 后,4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,取上清,以 BCA 试剂盒测定蛋

白质量浓度。加入适量 Loading buffer, 使用 PCR 仪在 95 ℃、12 min 条件下使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 于 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h, 加入一抗 4 ℃ 孵育过夜, 加入二抗室温孵育 1 h, 加入 ECL 显色液, 显影并定影。以 β -actin 为内参, 采用 Image J 软件分析各条带灰度值。

2.10 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。若数据方差齐, 多组比较采用单因素方差分析, 组间比较采用最小显著性差异法 (LSD); 若方差不齐, 采用 Dunnett's 检验。

3 结果

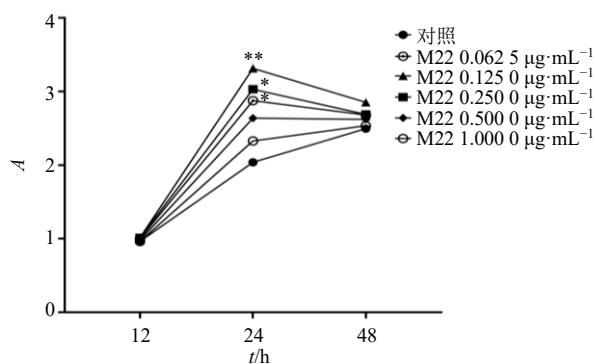
3.1 海藻-甘草含药血清对 M22 诱导的 Nthy-ori-3-1 细胞增殖的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 0.062 5、0.125 0、0.250 0 $\mu\text{g/mL}$ 的 M22 作用 24 h, 能够显著促进细胞增殖 ($P < 0.05$ 、0.01), 其中以 0.125 0 $\mu\text{g/mL}$ 的 M22 促增殖作用最为明显。

经 0.125 $\mu\text{g/mL}$ 的 M22 处理 Nthy-ori-3-1 细胞 24 h, 再分别给予 5%、10%、15%、20% 海藻-甘草含药血清干预 24 h, 如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组细胞活力显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组细胞活力均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 以 15% 海藻-甘草含药血清效果最佳。

3.2 海藻-甘草含药血清对 M22 诱导的 Nthy-ori-3-1 细胞形态的影响

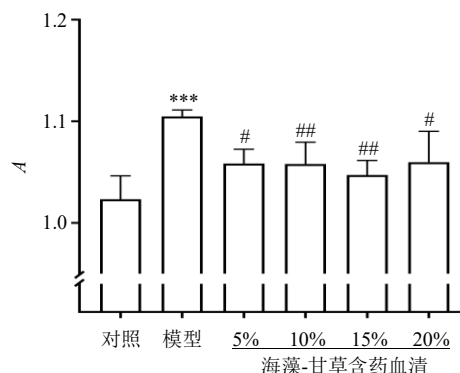
如图 3 所示, 对照组细胞为梭形或不规则形, 呈贴壁生长; 模型组细胞数量增多, 形态饱满, 出



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group.

图 1 M22 对 Nthy-ori-3-1 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Effect of M22 on proliferation of Nthy-ori-3-1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下图同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图 2 海藻-甘草含药血清对 M22 诱导的 Nthy-ori-3-1 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 2 Effect of *Sargassum-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* containing serum on proliferation of M22-induced Nthy-ori-3-1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

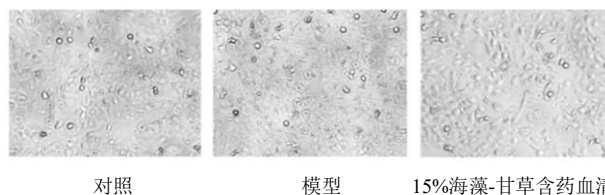


图 3 海藻-甘草含药血清对 M22 诱导的 Nthy-ori-3-1 细胞形态的影响 ($\times 100$)

Fig. 3 Effect of *Sargassum-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* containing serum on morphology of M22-induced Nthy-ori-3-1 cells ($\times 100$)

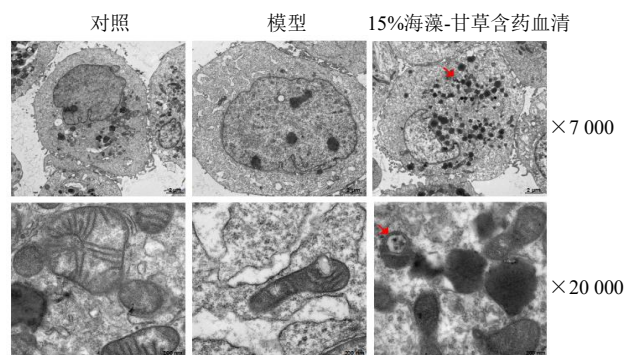
现过度增殖现象; 海藻-甘草含药血清干预后, 细胞增殖被抑制, 凋亡细胞增加, 细胞密度减少。

3.3 海藻-甘草含药血清对 M22 诱导的 Nthy-ori-3-1 细胞超微结构的影响

如图 4 所示, 对照组细胞形态正常, 边界清晰; 模型组细胞内质网发达扩张, 线粒体肿胀, 溶酶体较少; 海藻-甘草含药血清干预后, 自噬小体增多, 细胞肿胀减轻。

3.4 海藻-甘草含药血清对 M22 诱导的 Nthy-ori-3-1 细胞周期分布的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组 G_0/G_1 期细胞比例明显下降 ($P < 0.01$), S 期和 G_2/M 期细胞比例无明显差异; 与模型组比较, 海藻-甘草含药血清组 G_0/G_1 期细胞比例明显升高 ($P < 0.01$), S 期和 G_2/M 期细胞比例无明显差异。



箭头所指为自噬体结构。

Arrows point to autophagosome structure.

图 4 海藻-甘草含药血清对 M22 诱导的 Nthy-ori-3-1 细胞超微结构的影响

Fig. 4 Effect of *Sargassum-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* containing serum on ultrastructure of M22-induced Nthy-ori-3-1 cells

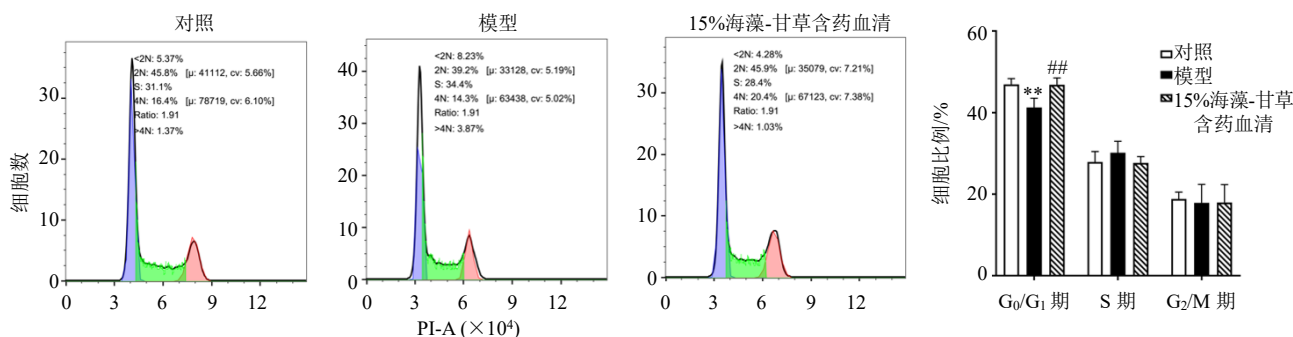


图 5 海藻-甘草含药血清对 M22 诱导的 Nthy-ori-3-1 细胞周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of *Sargassum-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* containing serum on cell cycle distribution of M22-induced Nthy-ori-3-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

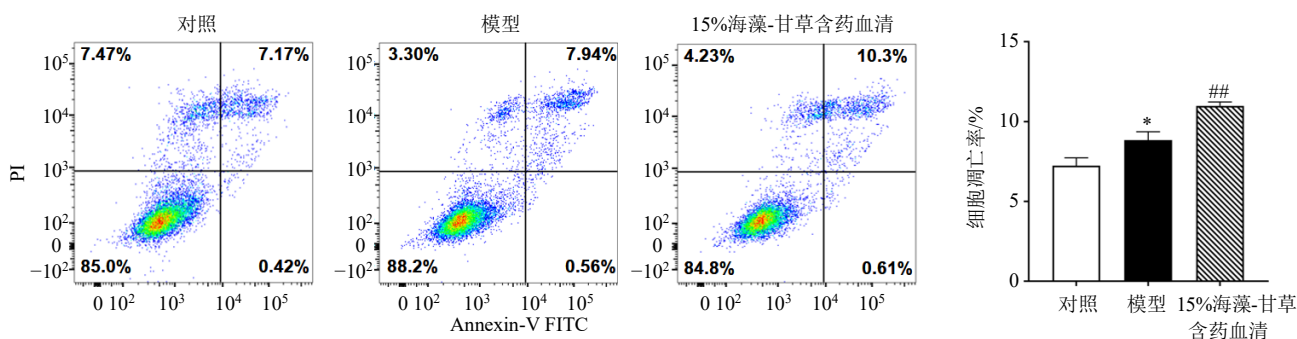


图 6 海藻-甘草含药血清对 M22 诱导的 Nthy-ori-3-1 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of *Sargassum-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* containing serum on apoptosis of M22-induced Nthy-ori-3-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

显著升高 ($P < 0.01$)。

4 讨论

甲状腺肿大是一种常见的内分泌系统疾病，常伴有甲状腺组织增生和细胞异常增殖，临床上常见于单纯性甲状腺肿大、甲状腺功能亢进或减退、甲

3.5 海藻-甘草含药血清对 M22 诱导的 Nthy-ori-3-1 细胞凋亡的影响

如图 6 所示，与对照组比较，模型组细胞凋亡率明显上升 ($P < 0.05$)；与模型组比较，海藻-甘草含药血清组细胞凋亡率显著上升 ($P < 0.01$)。

3.6 海藻-甘草含药血清对 M22 诱导的 Nthy-ori-3-1 细胞 LC3 表达的影响

如图 7 所示，与对照组比较，模型组 LC3 平均荧光强度降低；与模型组比较，海藻-甘草含药血清组 LC3 平均荧光强度增加。

3.7 海藻-甘草含药血清对 M22 诱导的 Nthy-ori-3-1 细胞 Beclin1 蛋白表达的影响

如图 8 所示，与对照组比较，模型组自噬关键蛋白 Beclin1 表达显著降低 ($P < 0.001$)；与模型组比较，海藻-甘草含药血清组 Beclin1 蛋白表达水平

甲状腺结节和甲状腺腺瘤等^[10,14]。古今治疗甲状腺腺大的方药中多包含有海藻和甘草的配伍组合，二者虽为反药，却在治疗甲状腺疾病中取得了良好的疗效^[15-17]。课题组前期研究表明，包含海藻-甘草配伍的海藻玉壶汤对甲状腺肿大模型大鼠的甲状腺

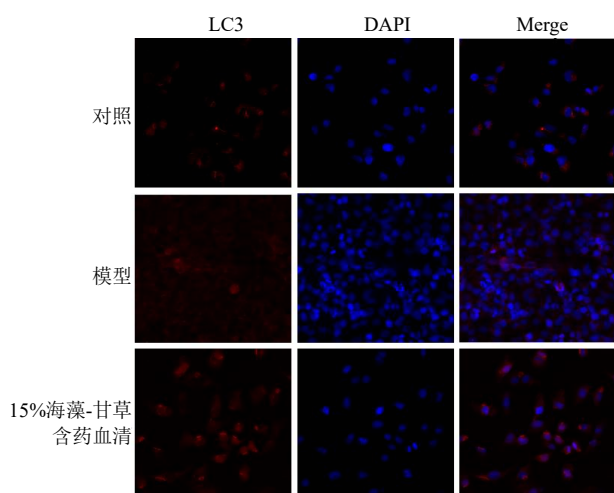


图 7 各组 Nthy-ori-3-1 细胞 LC3 平均荧光强度 ($\times 200$)
Fig. 7 Average fluorescence intensity of LC3 in Nthy-ori-3-1 cells of each group ($\times 200$)

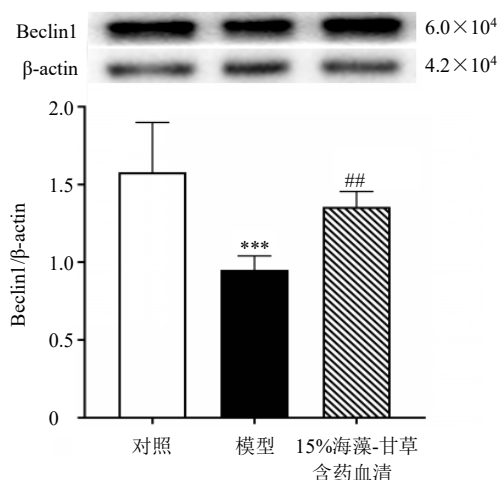


图 8 海藻-甘草含药血清对 M22 诱导的 Nthy-ori-3-1 细胞 Beclin1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of *Sargassum-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* containing serum on Beclin1 protein expression of M22-induced Nthy-ori-3-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

功能、甲状腺系数及甲状腺相关基因的表达均有明显的纠正作用，且全方组效果明显优于各拆方组，海藻、甘草二者缺一不可^[18-20]。

M22 现已广泛应用于建立毒性弥漫性甲状腺肿大 (Graves disease, GD) 和 Graves 眼病的细胞模型^[21]。GD 患者由于体内的促甲状腺激素受体抗体 (thyrotropin receptor antibody, TRAb) 分泌过多，导致了甲状腺肿大、甲状腺功能亢进等症状。M22 是来自于人体的 TSAb 单克隆抗体，TSAb 是 TRAb 的一种，TRAb 的功能与促甲状腺激素 (thyroid-stimulating hormone, TSH) 类似，因而 M22 可以模

拟 TRAb 的作用，与促甲状腺激素受体 (thyroid-stimulating hormone receptor, TSHR) 竞争性结合进行信号转导，从而引起甲状腺滤泡细胞的过度增殖，分泌过多的甲状腺激素^[22-24]。本研究采用 M22 刺激 Nthy-ori-3-1 细胞建立体外过度增殖模型，通过 CCK-8 法检测发现，M22 能明显促进 Nthy-ori-3-1 细胞增殖，并且 0.125 $\mu\text{g/mL}$ 的 M22 在作用 24 h 时促进细胞增殖的效果最佳。

经 M22 刺激的 Nthy-ori-3-1 细胞给予海藻-甘草含药血清后，呈现出典型的凋亡特征性改变，细胞数量减少，细胞生长增殖被抑制。流式细胞术结果显示，海藻-甘草含药血清能使 Nthy-ori-3-1 细胞的凋亡率明显升高。细胞周期有 2 个重要节点， G_0/G_1 期向 S 期的转换以及 S 期向 G_2/M 期的转换，S 期是 DNA 合成的重要时期。M22 可使 G_0/G_1 期细胞比例明显减少，S 期比例略有增加但无明显差异，提示细胞合成增加，细胞增殖被促进；经海藻-甘草含药血清作用后， G_0/G_1 期细胞比例增加，而 S 期和 G_2/M 期无明显差异，推测海藻-甘草含药血清可能主要在 G_0/G_1 期发挥作用，从而抑制 Nthy-ori-3-1 细胞的增殖。

本研究发现，海藻-甘草含药血清可能通过诱导自噬发生来促进 Nthy-ori-3-1 细胞的凋亡。LC3 和 Beclin1 是自噬形成过程的核心因子，其表达水平变化常用来监测自噬的发生及形成^[25-26]。本研究测定 Nthy-ori-3-1 细胞的 LC3 和 Beclin1 蛋白表达水平，结果显示与对照组比较，模型组 LC3 平均荧光强度降低，Beclin1 蛋白表达下调，这提示了在 M22 刺激 Nthy-ori-3-1 细胞增殖的过程中，伴有自噬功能的失调；而与模型组比较，海藻-甘草含药血清组 LC3 平均荧光强度明显升高，Beclin1 蛋白表达明显上调，提示海藻-甘草含药血清可能通过促进自噬的发生，从而促进细胞凋亡，发挥抗甲状腺肿大的作用。

本研究初探海藻-甘草对 M22 诱导的 Nthy-ori-3-1 细胞增殖模型的影响，发现海藻-甘草含药血清可以明显抑制 Nthy-ori-3-1 细胞增殖，促进其凋亡。同时，海藻-甘草含药血清可促进 LC3 与 Beclin1 蛋白表达，后续可研究自噬相关通路其他信号分子的表达情况，进一步探索海藻-甘草配伍对自噬功能的影响。自噬与增殖关系复杂，诱导自噬可能促进增殖，也有可能抑制增殖。本研究观察到海藻-甘草含药血清对自噬的抑制作用，进一步探讨其对细胞增殖的影响，可能为甲状腺疾病防治带来新的突破。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 田颐, 李慕云, 曹灿, 等. 基于毒效关系的“十八反”研究现状与思考 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(4): 1426-1430.
- [2] 于正山, 王雷. 甘草反海藻刍议 [J]. 青岛医药卫生, 2000, 32(2): 140-141.
- [3] 潘艳琼. 海藻、甘草同方应用探讨 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(17): 87-88.
- [4] 孟娟, 伍振辉, 彭蕴茹, 等. 海藻-甘草反药配伍致大鼠肾毒性的机制探讨 [J]. 中草药, 2018, 49(9): 2076-2083.
- [5] 修琳琳, 钟赣生, 张建美, 等. 海藻甘草反药组合宜忌条件的实验研究回顾与评析 [J]. 环球中医药, 2015, 8(9): 1044-1049.
- [6] 崔鹏, 王馨翊. 甲状腺肿中西医治疗研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(11): 154-156.
- [7] 罗晓群. 结节性甲状腺肿患者中医体质类型及其相关因素的调查分析 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
- [8] 字秋月, 丁永丽, 邓杨林, 等. 中医药治疗结节性甲状腺肿研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(5): 866-870.
- [9] 孙洁. 碘对甲状腺激素生物活性的结构作用 [J]. 大众标准化, 2021(13): 227-229.
- [10] Tamura M, Kimura H, Koji T, *et al.* Role of apoptosis of thyrocytes in a rat model of goiter. A possible involvement of Fas system [J]. *Endocrinology*, 1998, 139(8): 3646-3653.
- [11] 丁选胜, 阚毓铭, 李欧. 海藻甘草对甲状腺肿模型大鼠甲状腺激素及其抗体的影响 [J]. 中草药, 2003, 34(1): 54-56.
- [12] 王鑫, 葛超冉, 钟赣生, 等. 海藻玉壶汤加减海藻甘草反药组合对甲状腺肿大大鼠 PI3K/Akt 通路相关基因表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(2): 800-804.
- [13] 葛超冉, 王鑫, 钟赣生, 等. 海藻玉壶汤加减海藻甘草反药组合对甲状腺肿大模型大鼠甲状腺功能及 mTOR 蛋白表达的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2022, 45(5): 483-491.
- [14] 田文霞, 孙文广. 碘与甲状腺疾病的相关研究 [J]. 医学综述, 2017, 23(24): 4868-4872.
- [15] 陈绍红, 钟赣生, 刘佳, 等. 国家级名老中医临证应用海藻甘草反药组合的处方特征 [J]. 中国临床医生杂志, 2015, 43(6): 89-93.
- [16] 连雅君, 王庆国, 程发峰, 等. 王庆国应用海藻甘草反药的临床配伍规律探讨 [J]. 中医药导报, 2020, 26(1): 54-57.
- [17] 王利敏, 王青华, 关新军, 等. 反药药对甘草海藻古方合用分析 [J]. 浙江中医杂志, 2018, 53(6): 463.
- [18] 张晨. 海藻玉壶汤中加减高剂量甘草及不同品种海藻的药效及机制探讨 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [19] 王思睿, 修琳琳, 刘殿娜, 等. 含不同品种海藻与甘草反药组合的海藻玉壶汤对甲状腺肿大模型大鼠模型的影响 [J]. 环球中医药, 2017, 10(6): 641-645.
- [20] 王鑫, 葛超冉, 霍敏, 等. 海藻-甘草反药组合在海藻玉壶汤抗丙硫氧嘧啶致甲状腺肿大中的作用研究 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(8): 1391-1398.
- [21] Núñez Miguel R, Sanders J, Chirgadze D Y, *et al.* Thyroid stimulating autoantibody M22 mimics TSH binding to the TSH receptor leucine rich domain: A comparative structural study of protein-protein interactions [J]. *J Mol Endocrinol*, 2009, 42(5): 381-395.
- [22] 陈丽君. 结节性甲状腺肿发病机制研究进展 [J]. 基层医学论坛, 2020, 24(22): 3241-3243.
- [23] Jiang X C, Zha B B, Liu X M, *et al.* STAT6 deficiency ameliorates Graves' disease severity by suppressing thyroid epithelial cell hyperplasia [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(12): e2506.
- [24] 魏军平, 郑慧娟, 李敏, 等. 甲亢宁胶囊含药血清对 M22 刺激 FRTL-5 细胞增殖的影响及自噬在其中的作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(10): 1222-1228.
- [25] Klionsky D J, Abdelmohsen K, Abe A, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) [J]. *Autophagy*, 2016, 12(1): 1-222.
- [26] Quiles J M, Najor R H, Gonzalez E, *et al.* Deciphering dunctional roles and interplay between Beclin1 and Beclin2 in autophagosome formation and mitophagy [J]. *Sci Signal*, 2023, 16(770): eabo4457.

[责任编辑 李亚楠]