

· 综述 ·

亚临床甲状腺功能减退症动物模型的研究进展

王隽书 杨光燃

【摘要】 近年来,为了更好的研究亚临床甲状腺功能减退症的发病机制,国内外学者纷纷尝试建立各种亚临床甲状腺功能减退症动物模型。查阅既往文献,亚临床甲状腺功能减退症动物造模方法有以下 4 种:应用抗甲状腺药物造模,手术切除甲状腺后再补充左甲状腺素造模,单侧甲状腺电凝毁损法造模,基因敲除的方法造模。各种造模方法各有其优势和弊端。成功建立亚临床甲状腺功能减退症动物模型,对其发病机制的进一步研究及其指导临床治疗具有重要意义。

【关键词】 亚临床甲状腺功能减退症;促甲状腺激素;动物模型

基金项目:国家自然科学基金(81471009);北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划(2014-3-013)

Recent progress of subclinical hypothyroidism animal models Wang Junshu, Yang Guangran. Department of Endocrinology, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China

Corresponding author: Yang Guangran, Email: gr.yang@ccmu.edu.cn

【Abstract】 In recent years, scholars domestically and abroad have tried to establish all kinds of sub-clinical hypothyroidism animal models in order to study its pathogenesis. According to previous literature review, four kinds of methods about inducing subclinical hypothyroidism animal models are introduced: administration of anti-thyroid drug, supplementation with levothyroxine after surgical removal of thyroid gland, hemi-thyroid electrocauterization, the method of gene knockout. Each method possesses its own advantages and disadvantages. Successful establishment of subclinical hypothyroidism animal models is very important for the studies of the pathogenesis and clinical treatment.

【Key words】 Subclinical hypothyroidism; Thyrotrophin; Animal models

Fund program: National Natural Science Foundation of China(81471009); Beijing Municipal Training Foundation for Highly-qualified and Technological Talents of Health System (2014-3-013)

亚临床甲状腺功能减退症(SCH)定义为血清促甲状腺激素(TSH)水平升高,游离甲状腺素在正常范围之内,伴或不伴甲状腺功能减退症的症状与体征^[1]。随着测定 TSH 放射免疫技术的不断进步,SCH 的诊断率越来越高^[2]。对中国 10 个城市 15 008 人的队列研究发现,SCH 患病率为 16.7%,且呈令人担忧的增高趋势^[3]。本病的主要危害是影响脂代谢、增加心血管疾病的风险、影响妊娠进程及妊娠期患者后代智力发育、引起成年人脑认识功能的损害及影响骨代谢等,其诸多危害已经被许多研究证实,但发病机制未明。鉴于伦理学和人体研究难以实现的原因,建立可靠的动物模型是研究 SCH 的重要环节,对其发病机制的进一步研究及其指导临床治疗具有重要意义。现就近年来 SCH 动物模型

制备的研究进展予以综述。

1 模型动物的选择

制备人类疾病动物模型,应选择其组织形态、分子特点、功能、代谢和人类尽量相似的实验动物,以达到充分模拟人类疾病的目的^[4]。一般来说,动物进化程度越高,其结构、功能也越接近于人类。目前,用于制作 SCH 动物模型的实验动物多选择小鼠、大鼠等,各种实验动物在 SCH 研究中都各有特点。小鼠的甲状腺功能以及下丘脑-垂体-甲状腺轴与人类甲状腺功能比较相近,因为小鼠的进化过程与人类非常相似,都是从水生类到爬行类、两栖类、哺乳类进化而来,而且小鼠基因与人类基因的同源性在 90% 以上,基因容易操纵,所以小鼠 SCH 模型在 SCH 研究中应用广泛。大鼠的甲状腺功能以及下丘脑-垂体-甲状腺轴与人类也基本相似,分布广、繁殖快、易于饲养管理,且大鼠采血、注药、灌胃等操作比较方便。大鼠在呼吸系统、循环系统、神经系

统、解剖结构等方面与小鼠相比与人类更加接近,是更好的研究人类疾病的动物模型。在国内外有关文献报道中,研究者大多以大鼠作为 SCH 动物模型的实验动物。

2 SCH 动物造模方法

目前主要报道有 4 种方法建立 SCH 动物模型:(1)应用抗甲状腺药物如甲巯咪唑^[5-6]或丙硫氧嘧啶^[7]造模。(2)手术切除甲状腺,后再补充左甲状腺素(L-T₄)或植入 L-T₄ 微渗泵建立 SCH 大鼠模型。(3)单侧甲状腺电凝毁损法建立 SCH 大鼠模型。(4)基因敲除的方法建立 SCH 小鼠模型。造模成功的依据是实验动物血清 TSH 高于对照组,而总甲状腺素水平和对照组比较差异无统计学意义。

2.1 应用抗甲状腺药物诱导 SCH 模型 给予造模动物饲喂化学药物,如甲巯咪唑或丙硫氧嘧啶,通过减少甲状腺激素合成来建模。应用药物建立 SCH 大鼠模型,对药物选择及剂量有严格的要求,轻微过量则形成临床甲状腺功能减退症模型,药量不足则难以成模,成模后的稳定性也易受多方面因素的影响。因此药物建模的时间点及稳定性具有重要意义。甲巯咪唑及丙硫氧嘧啶的作用机制为抑制甲状腺滤泡内过氧化物酶,从而阻滞吸聚到甲状腺的碘化物的碘化和酪氨酸的耦联,阻碍甲状腺素和三碘甲状腺原氨酸的合成。与丙硫氧嘧啶相比,甲巯咪唑的生物有效作用时间长,血药浓度更平稳。有研究表明,甲巯咪唑 30 mg 每日 1 次给药和 10 mg 每日 3 次给药的临床效果相同,大剂量单次给药能显著减少临床不良反应的发生,因此,甲巯咪唑更有利于每天 1 次给药^[8]。基于以上原因在 SCH 造模药物选择甲巯咪唑每天上午 1 次给药,更符合甲巯咪唑的药代动力学,也更省时省力。

Gao 等^[9]采用每日给大鼠 10 mg/kg 体重甲巯咪唑灌胃,共喂饲 3 个月,每天监测大鼠的体重,每 2 周检测血清甲状腺素,至第 45 天 TSH 较对照组升高($P < 0.05$),血清甲状腺素正常,提示 SCH 大鼠造模成功。黄婧等^[10]采用每日给大鼠 5 mg/kg 体重甲巯咪唑灌胃,共 3 个月,每 2 周检测血清甲状腺素、TSH,第 6 周 TSH 较对照组升高($P < 0.05$),SCH 大鼠造模成功。陈巍等^[11]分别采用以往文献报道的 2 个低、高剂量,即甲巯咪唑 5 mg/kg 体重和 10 mg/kg 体重,每日 1 次灌胃的方法建立 SCH 大鼠模型,以血清 TSH 及 T₄ 水平为诊断依据,结果发现,按甲巯咪唑 5 mg/kg 体重给药时 90 d 成模,成模

率 60%;按甲巯咪唑 10 mg/kg 体重给药时 45 d 成模且 90 d 时稳定性好,90 d 时成模率 66%。但 2 组均在 120 d 时稳定性差,提示甲巯咪唑 10 mg/kg 体重是大鼠 SCH 造模的最佳给药量^[9-10]。Song 等^[5]选择 6~8 周雄性昆明小鼠 25 只,适应性喂养 1 周后,随机分为两组,一组给予甲巯咪唑(4 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)饮水,另一组给予饮用自来水作为对照,期间根据小鼠体重变化调节甲巯咪唑用量,2 个月后检测血清中 FT₃ 及 TSH 水平变化,发现造模组血清 TSH 水平明显升高,而 FT₃ 水平两组无统计学差异,成功的诱导小鼠 SCH 模型,成模率 92%。但是此种方法并不能保证小鼠每天能够饮用足量的含药物的水,故也存在一定缺陷。

亦有一些研究应用丙硫氧嘧啶造模。Issa 和 El-Sherif^[7]在研究人参对成年雄性 SCH Wistar 大鼠睾丸的影响时,通过喂饲成年雄性 Wistar 大鼠(5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)丙硫氧嘧啶,3 周后成功建立 SCH 大鼠模型。Tank 等^[12]通过喂饲 11 周龄辛克莱乳猪(0.05~0.10)% 丙基硫氧嘧啶和(0.1~0.2)% 葡萄糖液混合液,14 周后成功建立甲状腺功能减退症动物模型。Chen 等^[13]在研究血管生成和相关信号的生理机制过程中,通过丙硫氧嘧啶喂饲 2 月龄 C57BL/6J 小鼠 6 周,成功建立甲状腺功能减退症动物模型。

应用抗甲状腺药物诱导 SCH 模型方法简便,只要掌握好给药剂量,并根据大鼠的体重调整给药剂量,则 SCH 成模率较高。但是因抗甲状腺药物本身对生长发育存在影响,故此种方法也存在一定弊端。

2.2 甲状腺切除制备 SCH 模型 手术切除甲状腺后补充 L-T₄,这是目前应用较多的造模方法。Lu 等^[14]参照 Escobar 的方法,选用 48 只 Wistar 雌性大鼠,分为正常对照组(24 只),实施假甲状腺切除术;L-T₄ 处理 I 组(8 只),实施甲状腺全切术;L-T₄ 处理 II 组(8 只),实施甲状腺全切术;甲状腺功能减退症组(8 只),实施甲状腺全切术;对照组和甲状腺功能减退症组每天腹部皮下注射安慰剂,L-T₄ 处理 I 组每天腹部皮下注射 0.95 μg/100 g 体重的 L-T₄,L-T₄ 处理 II 组每天腹部皮下注射 1.00 μg/100 g 体重的 L-T₄。当实验组血清 TSH 高于对照组,而血清总甲状腺素和对照组没有统计学差异时,提示 SCH 造模成功。L-T₄ 处理 I 组造模成功率 75%,L-T₄ 处理 II 组造模成功率 50%。17 d 后,对组织甲状腺激

素水平的测定发现,SCH 组动物肾脏总甲状腺素水平和对照组没有差异,但 SCH 组动物肝脏总三碘甲状腺原氨酸水平显著低于对照组,说明 SCH 动物组织中已经处于甲状腺功能减退症状态。杨瑞霞和陈如泉^[15]采用甲状腺全切术后皮下注射左甲状腺素针剂的方法造模,于甲状腺全切术后连续 3 d 腹腔注射青霉素 50 000 U/只,以预防感染,并饲以普通饲料和高钙水(0.1% Ca²⁺)。2 周后开始每天腹部或腹股沟区皮下注射剂量为 9.5 μg/kg 体重的左甲状腺素针剂,16 d 后成功的建立了 SCH 模型。

因妊娠期 SCH 可能影响后代的发育,对 SCH 孕鼠的造模方法亦也有一些文献报道。于晓会等^[16]参照 Escobar-Morreale HF 的方法,采用手术切除大鼠甲状腺后,于其背部皮下植入微渗泵,泵中的 L-T₄ 以 1.0 μg/(100 g · d) 浓度持续泵入,当血清 TSH 高于正常、而血清总甲状腺素水平在正常范围时,提示 SCH 鼠建模成功,成模率为 60%。10 d 后使 SCH 雌鼠与正常的雄鼠合笼交配,自妊娠第 15 天始将 L-T₄ 剂量调整为 1.05 μg/(100 g · d),持续输注至仔鼠出生后 10 d,从而建立了 SCH 的孕鼠模型,用以观察母体 SCH 可能对后代的影响。

以上 SCH 模型是在甲状腺全部切除的基础上建立的,甲状腺切除术后 SCH 动物模型方法成熟、简便,如果完全切除动物甲状腺,再给予甲状腺素的替代,可以成功的建立 SCH 鼠模型。但是此种方法也存在一定的弊端,手术切除甲状腺后补充 L-T₄ 从病程上更类似于临床甲状腺功能减退症治疗不充分,同时存在一定的手术技巧问题,还存在手术切除导致的出血、喉上神经及喉返神经损伤、术后感染等风险。

2.3 单侧甲状腺电凝毁损法建立 SCH 模型 Ge 等^[17-18] 报道,采用单侧甲状腺电凝毁损的方法建立 SCH 大鼠模型。电凝术前对大鼠进行常规消毒,纵向切开颈部皮肤,逐层分离,暴露气管,然后使用 RF-1 双极电凝器,24 瓦高频功率电凝毁损右侧及峡部甲状腺组织,保留左侧甲状腺。结果发现,单侧甲状腺电凝毁损术的大鼠 2 周后血清 TSH 水平较假手术组升高($P < 0.01$),而血清 FT₄ 和 T₃ 水平则与假手术组无显著差异,其造模成功率为 66.6%。

与甲状腺切除术建立 SCH 动物模型相比,单侧甲状腺电凝毁损术出血相对较少、其他手术相关并发症发生率低。以上研究结果显示,单侧甲状腺电凝毁损建立 SCH 动物模型是一种简便易行的造模

方法。但是,由于单侧电凝毁损法建立 SCH 模型需要一定的操作技术,且其成模稳定性欠佳,成模率不高,故临床应用不多。

2.4 基因敲除的方法建立 SCH 模型 赵静和苟云久^[4] 报道,通过转基因方式建立甲状腺功能减退症模型,建立转基因动物的主要策略有两种,一种是让转基因在动物体内过度表达的方法,另一种是让基因在体内灭活、丧失其功能,即基因敲除技术。TSH 受体在调节脂代谢中起重要作用。Zhang 等^[19] 研究 TSH 在调节肝脏 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶磷酸化的机制时,成功构建了全身特异性敲除 TSH 受体的小鼠模型,结果显示, TSH 通过肝脏的 AMP 活化蛋白激酶途径减少 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶磷酸化的表达,在调节胆固醇合成中发挥重要作用。TSH 受体基因敲除小鼠因为缺乏 TSH 受体基因,甲状腺滤泡细胞 TSH 受体缺如,对垂体分泌的 TSH 无反应,不能发挥合成、分泌甲状腺激素的功能,继而甲状腺对垂体的负调控作用消失,体内 TSH 水平不断升高,当在小鼠饲料中补充合适的 T₄ 后,通过负反馈可以人为的控制 T₄ 水平在正常范围,解除了 T₄ 对垂体分泌的 TSH 的负反馈效应,从而正常的解释 TSH 在体内的生物学效应。王琦等^[20] 为探讨 TSH 调节肝脏 AMP 活化蛋白激酶 α 亚基的多磷酸化位点,揭示 TSH 调节 AMP 活化蛋白激酶 α 活性可能存在的机制,成功构建了全身特异性敲除 TSH 受体基因的小鼠模型,结果显示 TSH 通过 TSH 受体调节肝脏 AMP 活化蛋白激酶 α 苏氨酸 172 而非丝氨酸 173 的磷酸化。由于各种因素的影响,制备转基因动物的效率为 1%~10%,而且阳性结果重复性较差^[4]。

综上所述,以上各种方法各有优势。第一,应用抗甲状腺药物诱导 SCH 模型方法简便,但一定要严格掌握好给药剂量,此种方法的弊端是除了药物直接的不良反应外,还对生长发育有一定影响。第二,甲状腺切除建立 SCH 模型方法成熟、简便、成模率高,但更类似于临床甲状腺功能减退症治疗不充分,同时存在出血、神经损伤、感染等并发症。第三,单侧甲状腺电凝毁损术出血相对较少、其他手术相关并发症发生率低。但是,由于其需要一定的操作技术,成模率不高,故临床应用不多。第四,基因敲除的方法是敲除 TSH 受体基因让动物处于 SCH 状态,这种方法存在操作过程复杂、技术性强、成模率低等缺点。

3 问题与展望

SCH 目前是一种比较常见的内分泌疾病, 关于 SCH 的危害已经得到证实, 尤其是近年来, 妊娠早期 SCH 对孕妇和胎儿的影响, 特别是对胎儿神经智力发育的影响已经引起内分泌学、妇产科学、优生学界的广泛关注。对 SCH 发病机制等方面的研究越来越深入, 但是基于伦理学原因, 对 SCH 的发病机制的临床研究受到一些限制。在 SCH 动物模型上进行 SCH 发病机制、防治及新药的研制等有着重要意义。建立可控性强、重复性好、简便易行的 SCH 动物模型, 是进行深入实验研究的前提。但是国内外关于 SCH 的实验研究资料一直较少, 另外由于研究目的不同、造模方法不同、观察指标不同, 在给药途径、用药剂量、造模时间上差异很大, 缺乏规范化、标准化, 会给研究带来不便, 其结果的可靠性也受到质疑。因此, 探索 SCH 动物模型的造模方法任重道远。

参 考 文 献

- [1] Akter N, Qureshi NK, Ferdous HS. Subclinical hypothyroidism: a review on clinical consequences and management strategies [J]. J Med, 2017, 18(1): 30-36. DOI: 10.3329/jom.v18i1.31174.
- [2] 王秋虹, 魏军平. 亚临床甲状腺功能减退症实验研究进展 [J]. 福建中医药, 2012, 43(4): 63-64. DOI: 10.13260/j.cnki.jfjtem.010409.
- [3] Shan Z, Chen L, Lian X, 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. DOI: 10.1089/thy.2015.0613.
- [4] 赵静, 苛云久. 甲状腺功能低下动物模型研究进展 [J]. 中兽医医药杂志, 2015, 3: 75-78. DOI: 10.13823/j.cnki.jtcvm.2015.03.029.
- [5] Song Y, Zhang X, Chen W, et al. Cholesterol synthesis increased in the MMI-induced subclinical hypothyroidism mice model [J]. Int J Endocrinol, 2017, 2017: 7921071. DOI: 10.1155/2017/7921071.
- [6] Wu K, Zhao M, Ma C, et al. Thyrotropin alters T cell development in the thymus in subclinical hypothyroidism mouse model [J]. Scand J Immunol, 2017, 85(1): 35-42. DOI: 10.1111/sji.12507.
- [7] Issa NM, El-Sherif NM. Effect of ginseng on the testis of subclinical hypothyroidism model in adult male albino rat [J]. Austin J Anat, 2017, 4(2): 1065.
- [8] 梁少珍, 吴丽彩, 黄翠莹. 观察不同剂量甲巯咪唑治疗 Graves 病的疗效及其对促甲状腺激素受体抗体 (TRAb) 的影响分析 [J]. 国际医药卫生导报, 2014, 20(4): 531-534. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-1245.2014.04.032.
- [9] Gao C, Li T, Liu J, et al. Endothelial functioning and hemodynamic parameters in rats with subclinical hypothyroid and the effects of thyroxine replacement [J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0131776. DOI: 10.1371/journal.pone.0131776.
- [10] 黄婧, 郭天康, 刘静, 等. 亚临床甲状腺功能减退大鼠骨代谢改变及左旋甲状腺素疗效 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2015, 8(1): 43-47. DOI: 10.3969/j.issn.1674-2591.2015.01.008.
- [11] 陈巍, 高天舒, 张凤暖, 等. 甲巯咪唑致亚临床甲减大鼠模型评价 [J]. 长春中医药大学学报, 2017, 33(1): 43-46. DOI: 10.13463/j.ccyy.2017.01.015.
- [12] Tank JC, Weiner DS, Jacquet R, et al. The effects of hypothyroidism on the proximal femoral physis in miniature swine [J]. J Orthop Res, 2013, 31(12): 1986-1991. DOI: 10.1002/jor.22467.
- [13] Chen J, Ortmeier SB, Savinova OV, et al. Thyroid hormone induces sprouting angiogenesis in adult heart of hypothyroid mice through the PDGF-Akt pathway [J]. J Cell Mol Med, 2012, 16(11): 2726-2735. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2012.01593.x.
- [14] Lu L, Yu X, Teng W, et al. Treatment with levothyroxine in pregnant rats with subclinical hypothyroidism improves cell migration in the developing brain of the progeny [J]. J Endocrinol Invest, 2012, 35(5): 490-496. DOI: 10.3275/7967.
- [15] 杨瑞霞, 陈如泉. 温肾方对亚临床甲状腺功能减退模型大鼠心肌组织 T3 及甲状腺激素受体的影响 [J]. 中医学报, 2013, 28(7): 989-991. DOI: 10.16368/j.issn.1674-8999.2013.07.044.
- [16] 于晓会, 刘爱华, 朱帅俊, 等. 孕期亚临床甲减大鼠模型的建立 [J]. 实用预防医学, 2015, 22(6): 686-689. DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2015.06.014.
- [17] Ge JF, Peng L, Hu CM, et al. Impaired learning and memory performance in a subclinical hypothyroidism rat model induced by hemi-thyroid electrocauterisation [J]. J Neuroendocrinol, 2012, 24(6): 953-961. DOI: 10.1111/j.1365-2826.2012.02297.x.
- [18] Ge JF, Xu YY, Li N, et al. Resveratrol improved the spatial learning and memory in subclinical hypothyroidism rat induced by hemi-thyroid electrocauterization [J]. Endocr J, 2015, 62(10): 927-938. DOI: 10.1507/endocrj.EJ15-0253.
- [19] Zhang X, Song Y, Feng M, et al. Thyroid-stimulating hormone decreases HMG-CoA reductase phosphorylation via AMP-activated protein kinase in the liver [J]. J Lipid Res, 2015, 56(5): 963-971. DOI: 10.1194/jlr.M047654.
- [20] 王琦, 于春晓, 高聆, 等. 甲状腺激素调节肝脏 AMPK α Thr 172 而非 Ser 173 的磷酸化 [J]. 山东大学学报(医学版), 2014, 52(6): 22-27. DOI: 10.6040/j.issn.1671-7554.0.2013.611.

(收稿日期: 2017-09-20)