

夏宗霄, 刘海鹏, 张艳娇, 等. 甲状腺疾病动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 87-93.

Xia ZX, Liu HP, Zhang YJ, et al. Research progress on animal models of thyroid disease [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 87-93.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 02. 013

甲状腺疾病动物模型的研究进展

夏宗霄^{1#}, 刘海鹏^{2#}, 张艳娇¹, 范源^{2*}

(1. 云南中医药大学中药学院, 昆明 650500; 2. 云南中医药大学第二附属医院, 昆明 650216)

【摘要】 甲状腺疾病是一种临床上常见的内分泌疾病, 其病因机制复杂多样。目前关于甲状腺疾病的研究主要局限于临床上的药效评价, 对其发病机制研究较少, 因此甲状腺疾病动物模型的建立对分析该类疾病的病理机制以及提高临床疗效有着较为重要的意义, 成功的实验动物模型不仅能降低实验成本, 还具有可行性、重复性高等特点。本文就近年来关于甲状腺功能减退症、甲状腺功能亢进症、桥本甲状腺炎、甲状腺癌等甲状腺疾病动物模型的建立方法做一总结归纳, 并对各类模型的优缺点进行分析, 为相关实验的开展提供理论依据。

【关键词】 甲状腺疾病; 药物; 核酸免疫; 转基因; 动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 02-0087-07

Research progress on animal models of thyroid disease

XIA Zongxiao^{1#}, LIU Haipeng^{2#}, ZHANG Yanjiao¹, FAN Yuan^{2*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China.

2. Second Affiliated Hospital of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650216)

【Abstract】 Thyroid disease is a common endocrine system disease, and its etiology is complex and diverse. At present, research on thyroid diseases is mainly limited to the evaluation of clinical efficacy of drugs with few studies on the pathogenesis of this disease. Therefore, it is important to establish animal models of thyroid diseases for analyzing pathological mechanisms and improving the clinical efficacy of disease treatment. A successful experimental animal model can not only increase disease samples in a short period of time with low cost but also avoid harm to the human body. Furthermore, animal models have the advantage of stability. This review summarizes the method used to establish animal models of thyroid diseases in recent years, such as those for hypothyroidism, hyperthyroidism, hashimoto's thyroiditis, and thyroid cancer, and analyzes the advantages and disadvantages of various models to provide a theoretical basis for the development of related experiments.

【Keywords】 thyroid disease; medicine; nucleic acid (cDNA) immunization; transgene; animal model

目前全球范围内甲状腺疾病患病率显著增加, (甲减)、甲状腺功能亢进症(甲亢)、桥本甲状腺炎
甲状腺疾病在临床上主要分为甲状腺功能减退症 (hashimoto's thyroiditis, HT)、甲状腺癌等, 但其具

【基金项目】 国家自然科学基金地区基金项目(81360652); 云南省科技厅科技计划项目-应用基础研究计划(202101AZ010001-015); 云南省万人计划“名医”专项; 云南省高校中西医结合防治甲状腺病重点实验室项目。

【作者简介】 夏宗霄(1998—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药理应用与研究。E-mail: 18381816250@163.com

刘海鹏(1973—), 男, 汉族, 副主任医师, 研究方向: 2 型糖尿病及其相关慢性并发症。E-mail: 1114914713@qq.com

[#] 共同第一作者

【通信作者】 范源(1966—), 男, 主任医师, 教授, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 卟啉类化合物治疗甲状腺癌的研究。

E-mail: 1647909799@qq.com

体的发病机理仍尚未明确。甲状腺疾病作为临床上常见的内分泌疾病,其疾病的发生、发展与诸多因素有关,目前公认的主要疾病影响包括年龄、性别、吸烟、碘缺乏或碘过量、应激、遗传、自身免疫、环境等因素^[1]。具调查统计甲减和亚临床甲减的患病率分别约为 0.1%~2%和 4%~10%^[2],其中甲减患者的甲状腺激素分泌与合成不足,亚临床甲减患者的甲状腺激素在正常范围,但促甲状腺激素含量偏高,且会出现甲状腺肿大等症状。在欧洲和美国,甲亢的患病率大致相似分别为 0.7%和 0.5%^[3],亚甲亢的患病率为 0.4%~11%不等^[4],其中甲亢患者甲状腺激素分泌与合成偏高,而亚甲亢患者甲状腺激素在正常范围,但促甲状腺激素含量偏低。HT 是一种常见的自身免疫性甲状腺疾病(autoimmune thyroid disease, AITD), AITD 是一种甲状腺组织自身免疫紊乱的疾病,临床上表现为滤泡细胞萎缩、淋巴细胞浸润、甲状腺肿和纤维化。据统计 AITD 女性发病率为每 1 千人 3.5~5 例,而男性发病率为每 1 千人 0.6~1 例^[5]。过去 30 年里,全球甲状腺癌的发病率显著增加,由 1975 年每 10 万人 5 例增加到 2015 年每 10 万人 15 例,特别是乳头状甲状腺癌,约占甲状腺癌的 85%^[6]。目前关于甲状腺疾病动物模型研究较少,对甲状腺疾病的造模还处于一个逐步成熟的阶段,关于甲状腺疾病的病因、病理等尚未完全明确。因此建立重复性高、稳定性好的甲状腺疾病动物模型,对深入研究甲状腺疾病的发病机制以及早期的干预有着十分重要的意义。本文在查阅大量文献的同时结合团队前期造模经验对甲状腺疾病动物模型做一总结归纳,以期对相关实验的开展提供理论依据。

1 甲状腺功能减退(甲减)模型的建立

1.1 药物诱导的甲减模型

通常使用丙硫氧嘧啶(PTU)或甲巯咪唑(MMI)等抗甲状腺药物,减少机体甲状腺激素的合成建立甲减模型。Sun 等^[7]喂养雌性 SD 大鼠含 PTU(2 mg/(kg·d))的饮用水 6 周,观测到大鼠行动迟缓且毛发变成棕黄色,用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测其血清水平,与正常组相比,甲减组血清 T3、T4 偏低, TSH 偏高($P<0.01$)。Li 等^[8]喂养雄性 Wistar 大鼠甲减组含 MMI 的饮用水(60 mg/(kg·d)) 12 周,测得血清 T3、T4 显著降低($P<0.001$), TSH 升高($P<0.01$)。

药物诱导甲减是最常用的造模方法,且造模难度较小,成功率高。但若想要持续维持甲减状态,需连续不间断给予促甲状腺素药物维持高激素水平,否则药物会在体内逐渐消除使机体功能恢复正常。

1.2 甲状腺切除术甲减模型

Lee 等^[9]将 6 周龄雄性 SD 大鼠分别进行甲状腺切除手术和垂体切除手术,并设立相同数量的假手术组。经过 1 周的手术适应期后,用 ELISA 法检测其血清水平,发现甲状腺切除组与其假手术相比血清 T3、T4 降低, TSH 升高($P<0.05$);垂体切除组与其假手术相比血清 T3、T4、TSH 均有所降低($P<0.05$)。Li 等^[8]对雄性 Wistar 大鼠进行甲状腺切除手术,测得血清 T3、T4 显著降低($P<0.01$), TSH 升高($P<0.05$)。

用手术切除甲状腺造模比药物诱导耗时更短,但难度较高,手术不当容易造成大鼠死亡,若甲状腺切除不完全会对血清测定结果造成影响。

1.3 低碘诱导甲减模型

Alayoubi 等^[10]将 SD 大鼠随机分为两组,低碘组给予碘缺乏鼠粮(含 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 碘化物),对照组给予碘正常鼠粮(含 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 碘化物),喂养观察 17 个月。1 个月后测得碘缺乏组血清 T3、T4 水平显著降低($P<0.001$),在 10 月时达到最低值,血清 TSH 则呈上升趋势,在 9~12 个月时达到最大值($P<0.001$)。因 SD 大鼠处于生长期,其甲状腺重量总是与年龄和体重呈正比,故采取超声三维成像来测量甲状腺体积占体重的比率,取平均值。经计算发现,在第 8 个月和第 14 个月时,该数值是对照组的两倍($P<0.05$)。Hu 等^[11]将 BALB/c 小鼠随机分为两组:低碘组给予碘浓度为 20~40 mg/kg 的低碘饲料,对照组给予碘浓度为 300 mg/kg 的标准饲料,饲养观察 3 个月。采用 ELISA 法测得低碘组血清 T3、T4 水平显著降低, TSH 升高($P<0.001$)。用 HE 染色法检测缺碘小鼠的甲状腺组织,发现滤泡细胞肿大并呈柱状,免疫组织化学结果显示甲状腺激素转运体 8(monocarboxylate transporter 8, MCT8)在甲状腺滤泡细胞胞浆中有较高的表达。经实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测,低碘组 MCT8 mRNA 表达明显增高,为对照组的 1.36 倍($P<0.01$)。

低碘建立甲减模型较为简单,但用时较长。需要注意的是不能完全除碘,因为提供绝对不含碘的鼠粮会直接影响大鼠的正常发育以及器官功能,且

大鼠可能无法在研究期间存活。

2 甲状腺功能亢进(甲亢)模型的建立

通常使用左甲状腺素等药物提高机体甲状腺激素的合成,诱导甲亢模型的产生。Jeddi 等^[12]将雄性 Wistar 大鼠随机分为甲亢组和对照组。在甲亢组的饮用水中添加左甲状腺素(12 mg/L),对照组给予蒸馏水,连续喂养 21 d。结果表明,甲亢组血清 T3、T4 水平显著升高,TSH 显著降低($P<0.001$)。Venediktova 等^[13]对甲亢组雄性 Wistar 大鼠进行腹腔注射左甲状腺素(100 $\mu\text{g}/100\text{ g}$),共计 5 d;对照组注射同等体积的生理盐水。发现甲亢组血清 T3 和 T4 分别比对照组增加了 3 倍和 4 倍($P<0.05$)。刘树民等^[14]分别对雌性 SD 大鼠灌胃左甲状腺素以及尾静脉注射小肠结肠炎耶尔森氏菌进行甲亢造模,发现左甲状腺素组造模初期 T3、T4、FT3、FT4 显著升高($P<0.05$),但 1 周后各激素水平随即恢复正常,经 HE 染色观察到甲状腺滤泡大小基本一致,滤泡胶质染色均匀,滤泡间质无水肿,与空白对照组无显著性差异。分别于第 7、14、25 天检测小肠结肠炎耶尔森氏菌模型组血清水平,发现在第 7 天时,血清 T3、T4 显著升高($P<0.05$),TSH 无明显差异,直到第 25 天时 TSH 明显升高,差异有统计学意义,经 HE 染色观察到甲状腺滤泡破坏,上皮细胞轻度增生且有少量的炎细胞存在。

3 桥本甲状腺炎模型的建立

3.1 自发性甲状腺炎模型

大部分自发性甲状腺炎造模所选取的实验动物是 NOD. $H-2^{\text{h4}}$ 小鼠。NOD. $H-2^{\text{h4}}$ 小鼠在 NOD 遗传背景下表达 $H-2^{\text{K}}$ 和 $I-A^{\text{K}}$ 基因,此种主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)的单倍型($H-2^{\text{K}}$)是桥本甲状腺炎的易感性单倍型,因此 NOD 小鼠发生 HT 概率很高^[15]。Braley-Mullen 等^[16]喂养 7~8 周龄的 NOD. $H-2^{\text{h4}}$ 小鼠 0.05%碘化钠饮用水 23 周,在第 6 周时所有小鼠均发生了 HT,第 8 周时炎症达到最大程度,IgG1 和 IgG2b 抗体水平明显升高($P<0.05$)。He 等^[17]喂养 5 周龄 NOD. $H-2^{\text{h4}}$ 小鼠 0.05%碘化钠饮用水,分别于 2、4、8 周对其甲状腺组织进行 HE 染色,发现甲状腺细胞在第 2 周开始凋亡($P<0.001$),在第 4 周 NOD. $H-2^{\text{h4}}$ 小鼠表现出 HT,喂养 16 周后炎症评分、抗甲状腺球蛋白抗体(anti-thyroglobulin antibody,

TG-Ab)水平明显高于对照组($P<0.001$)。

该种模型造模成功率极高,实验操作十分简单,但疾病周期较长,需在 SPF 清洁等级下 IVC 独立通气笼中喂养,若是动物发生死亡会耗费大量的时间和金钱成本。

3.2 外源性甲状腺抗原免疫法

甲状腺球蛋白(thyroglobulin, Tg)是 HT 患者中过度表达的主要抗原,该种蛋白分子在甲状腺中含量特别丰富,占总蛋白的 75%~80%^[18]。研究表明不同鼠类 $H-2$ 基因不同,对桥本甲状腺炎的易感性也不尽相同。高应答的如 CBA/J($H-2^{\text{k}}$)和 SJL/J($H-2^{\text{s}}$)种系鼠;而低应答如 BALB/c($H-2^{\text{d}}$)和 C57BL/6($H-2^{\text{b}}$)种系鼠^[19]。Wang 等^[20]将 4 周龄 CBA/J 雌性小鼠随机分为两组,模型组皮下注射 200 μg 被完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)乳化的鼠甲状腺球蛋白(murine thyroglobulin, mTg)进行初次免疫,两周后用相同剂量的 mTg 在不完全弗氏佐剂(incomplete Freund's adjuvant, IFA)乳化下进行加强免疫,而对照组小鼠则用相同剂量的磷酸盐缓冲盐水代替 mTg 免疫小鼠。结果表明对照组小鼠甲状腺滤泡均匀分布,无萎缩;而模型组小鼠甲状腺滤泡无序排列且伴有淋巴细胞浸润。具计算模型组小鼠 HT 的成膜率为 85.70%,甲状腺平均炎症得分为 2.29,经 ELISA 法测得模型组 TG-Ab 显著高于对照组($P<0.01$),但血清 T4 和 TSH 两组之间无显著性差异($P>0.05$)。李叙颖等^[21]将雌性 SD 大鼠适应性喂养 1 周,随机分为对照组和模型组。对照组给予蒸馏水,模型组给予 0.64 g/L 的高浓度碘化钠碘水。在第 4 周的第 1 天和第 4 天,于造模组大鼠后足皮下多点注射 0.2 mL 初次免疫乳化剂(含 100 μg mTg);第 5~8 周后在大鼠四肢内侧及背部皮下多点注射 0.2 mL 加强免疫乳化剂(含 100 μg mTg),每周 1 次;对照组每次注射同等剂量蒸馏水。结果显示,与对照组相比模型组 TG-Ab、抗甲状腺过氧化物酶抗体(anti-thyroid peroxidase antibody, TPO-Ab)水平显著升高($P<0.01$),血清 T3、T4 水平降低,TSH 水平升高($P<0.05$)。Duan 等^[22]选取 Wistar 大鼠进行造模,大鼠在第 1 天腹腔注射猪甲状腺免疫球蛋白(porcine thyroglobulin, pTg)进行初次免疫(150 μg pTg 溶于 75 μL 生理盐水中,并用等量的 CFA 进行乳化)。在第 7 天和第 21 天,大鼠进行注射 pTg 加强免疫(150 μg pTg 溶于 75 μL 生理盐水中,然后用等体积

IFA 乳化)。与生理盐水组相比,模型组 TG-Ab 水平显著升高($P<0.05$)。

3.3 脾细胞体外活化移植免疫法

Fang 等^[23]用 150 μg mTg 联合 15 μg 脂多糖(LPS)静脉注射 CBA/J 小鼠(每 10 d 1 次,共 2 次),抽取其脾细胞并在含有 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mTg 和 5 ng/mL IL-12 的培养基中培养,供活化使用,72 h 后将 3×10^7 个脾细胞静脉注射至经 500-rad 辐射的同源小鼠中,第 20 天后经 HE 染色甲状腺组织,观察到嗜中性粒细胞广泛浸润,严重等级为(4.8 ± 0.2),血清 T4 水平较正常水平偏低($2.8\pm 0.4\ \mu\text{g}/\text{dl}<3.0\ \mu\text{g}/\text{dl}$)。

脾细胞体外活化移植免疫法通常用来诱导肉芽肿性自身免疫性甲状腺炎(granulomatous experimental autoimmune thyroiditis, G-EAT),该方法与外源性甲状腺抗原免疫法相比甲状腺淋巴细胞浸润程度更为严重,易发生肉芽肿病变,且该种炎症通常在第 60 天消退或进展为纤维化,这取决于第 20 天甲状腺损伤的程度^[23]。

3.4 核酸免疫法(nucleic acid(cDNA)immunization, cDNA 免疫法)

核酸免疫法指克隆出人甲状腺球蛋白(human thyroglobulin, hTg)的全长 cDNA,再与腺相关病毒载体整合,将该腺病毒(5.0×10^9 个)溶于 50 μL 的磷酸缓冲溶液(含 10% 甘油),注入小鼠的胫骨肌肉中。该方法能使骨骼肌细胞大量摄取质粒 cDNA 并将其蛋白产物表达在细胞表面^[24]。Faustino 等^[25]选择雌性 CBA-J 小鼠作为核酸免疫的实验动物进行研究:模型组小鼠被表达 hTg 的腺病毒免疫(Ad-TG),阴性对照组被表达 lac-Z 的腺病毒免疫(Ad-LacZ),阳性对照组采取外源性甲状腺抗原免疫法,分别于第 1 天初次免疫和第 21 天加强免疫。结果表明,所有模型组小鼠 hTG 抗体均为阳性,与阴性对照组相比,实验组小鼠血清 hTg、mTg、mTPO 抗体水平显著提高($P<0.001$),但较阳性组抗体水平低。Jacobson 等^[26]在 cDNA 免疫前将布比卡因注射到雌性 C3H/Hen 小鼠右侧股四头肌中,因肌毒剂被证实能够提高靶基因的表达^[27],分为 2 组进行实验:对照组采用肌肉静脉注射含 hTg 的 cDNA,模型组采用电穿孔法注射含 hTg 的 cDNA,用 ELISA 法检测 TG-Ab 水平,发现与直接注射相比,电穿孔递送 cDNA 显著增加了再生肌肉中 TG-Ab 的水平($P<0.05$)。

cDNA 免疫法是一种建立 HT 动物模型的崭新途径,在开始产生免疫反应之前,以正确的构象将 hTg 呈递给了 T 细胞,且无需佐剂的参与,更接近地模拟出人类自身免疫性甲状腺炎的发生发展,除此外该方法使得修改 hTg cDNA 的基因序列成为可能,这将为今后研究不同 hTg 序列变异对机体的影响提供重要实验基础。除肌肉直接递送核酸外,最新的超声递送系统不仅具有更高的安全性和有效性,同时将实验侵袭性降到了最低,对实验动物的伤害大大减少^[28]。

4 甲状腺癌模型的建立

根据肿瘤起源及分化差异,甲状腺癌按病理类型主要分为:乳头状甲状腺癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)、滤泡样甲状腺癌(follicular thyroid carcinoma, FTC)、甲状腺髓样癌(medullary thyroid carcinoma, MTC)、低分化癌以及间未分化性甲状腺癌(anaplastic thyroid cancer, ATC)等。大数据显示,在这些亚型中 PTC 是最常见的,约占所有甲状腺癌 80%,FTC 约占 10%~15%,ATC 约占 5%,其余少数为 MTC^[29],其中 ATC 较分化良好的甲状腺癌转移程度更为严重,高达 70%的 ATC 患者会发生全身转移,肺是癌症转移中最常见的部位,占比高达 80%^[30]。

4.1 诱发性肿瘤模型

诱发性肿瘤模型指采用化学、生物、物理等致癌手段,如用化学致癌剂、放射线、生物毒素等方法诱发实验动物产生致癌物,造成动物组织、器官或全身性的损伤,产生功能及代谢改变等异常状况。Zheng 等^[31]将 50 只雄性 SD 大鼠随机分为 3 组,对第 2、3 组的动物分别给予致癌物,对照组(第 1 组)则在饮用水中添加赋形剂。第 2 组 SD 大鼠于腹腔内注射二乙基亚硝胺(DEN)(按重量计 100 mg/kg ,溶解于生理盐水溶液中),第 3 组 SD 大鼠分别在第 5、8、11 和 14 天腹腔内注射 4 次甲基亚硝脒(MNU)(按重量计 20 mg/kg ,溶解于柠檬酸盐缓冲液中,溶液 pH 6.0),实验结果显示,所有模型组血清 TG-Ab 水平明显高于对照组($P<0.05$),所有模型组的癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)水平明显高于对照组($P<0.05$)。Dalke 等^[32]将 F1 小鼠暴露于 I^{131} 中,发现受辐射照射的小鼠甲状腺癌变的概率明显高于未受辐射的对照组,大部分辐射小鼠的甲状腺存在单纯增生和复杂增生,较少部分发

展为 FTC。

诱发性肿瘤模型能在短时间内复制出数量较多的肿瘤模型,因而经常被研究者们采纳使用,其具有操作简单,成本低廉等特点。但由于该种模型通常是采用致癌药物迅速造模,难以观测肿瘤的动态发生、发展,只能用于简单的药效考察,不利于对甲状腺癌进行细胞及分子水平的研究。

4.2 基因工程小鼠模型

医学者们利用分子生物学对甲状腺癌进行不断探究发现,大多数甲状腺癌都伴随基因突变,包含原癌基因的激活性突变、融合性表达和抑癌基因的失活性突变或缺失。Pozdeyev 等^[33]对 779 例甲状腺癌患者进行了基因分析,发现 74% 的 PTC 患者 *BRAF* 基因发生了突变(特别是 *V600E* 和 *BRAF* 融合表达),42 例(9%)发生了 *RAS* 基因突变,34 例(7%)发生了 *RET* 基因突变,10% 的患者发生了抑癌基因 *TP53* 缺失,而大多数 FTC 患者则是发生了 *RAS* 基因突变(43/65 例,66%),其中 14% 发生了 *PTEN* 基因缺失,12% 发生了 *TP53* 和 *RBM10* 基因缺失,未分化甲状腺癌两个最常见的突变基因是 *TP53* 和 *TERT*(均为 65%)。

Knauf 等^[34]将 *Tg-BRAF^{V600E}* 系(*Tg-BRAF2* 和 *Tg-BRAF3*)表达于转基因 FVB/N 小鼠,让携带该基因的片段注入受精的 FVB/N 小鼠卵中,使之假孕,通过 qRT-PCR 法和 Southern blot 印迹杂交法确认胚胎小鼠已整合该转基因,最后将该胚胎小鼠与野生型 FVB/N 小鼠杂交,从中稳定产生 *BRAF^{V600E}* 突变株系。实验结果表明 *Tg-BRAF2* 和 *Tg-BRAF3* 小鼠的甲状腺组织中均存在 *BRAF^{V600E}* mRNA,尤其是在 *Tg-BRAF2* 小鼠中最为明显。5 周后,*Tg-BRAF2* 小鼠的 TSH 水平显著升高,雄性小鼠平均比对照组高出 80 倍,而 *Tg-BRAF3* 小鼠 TSH 水平较正常组增加 2 倍,血清 T3 水平有所下降但无统计学意义($P > 0.05$)。对 *Tg-BRAF2* 小鼠的甲状腺进行组织学检测,发现肿瘤累积甲状腺腺体两叶呈多灶性,肿瘤细胞显示出人类乳头状癌的核特征,其中 *Tg-BRAF2*、*Tg-BRAF3* 发展成 PTC 的概率分别为 93% 和 35%。McFadden 等^[35]将 *TPOCreER* 小鼠与含有 Cre 诱导的等位基因 *BRAF^{V600E}*、*BRAF^{CA}* 的同源小鼠杂交,后给予他莫昔芬数周(简称 TB 组),组织学检测表明其甲状腺肿瘤具有 TPC 相似的乳头状形态和核特征,免疫组织化学显示细胞外调节蛋白激酶磷酸化表达增加。将 *Trp53* 等位基因与 TB 组杂交

形成 TBP 三转基因小鼠后,表现出更为严重的 TPC(癌细胞体积变大,局灶性坏死增多),另有 50% 转变为 ATC,其中 5/26 只动物发生了肺转移(19%),说明 *TP53* 基因的缺失会增加 PTC 到 ATC 转变的概率。

甲状腺癌基因工程小鼠模型使人类对甲状腺疾病的研究已深入到细胞及分子水平,可以直接按照研究目的设计和培育所需的小鼠,这无疑是构建了人类对甲状腺癌原癌基因、抑癌基因、机制靶点等研究的桥梁,为发病机制、药物筛选和临床医药研究提供了宝贵的实验基础。但基因调控机制往往十分复杂,目前基因工程小鼠模型提供的信息还很局限,转基因小鼠的出现是否会导致新的癌基因产生,有待进一步研究。

4.3 异种移植甲状腺癌模型

异种移植甲状腺癌模型是指将人甲状腺瘤细胞皮下注射(异位移植)或甲状腺内注射(原位移植)到免疫缺陷小鼠中。张乐乐^[36]对雌性 BALB/c 裸鼠右后肢腹侧皮下注射 TPC-1 和 SW579 细胞悬液,发现接种 SW579 细胞的小鼠均未成瘤,接种 TPC-1 细胞裸鼠瘤体体积在第 5 天后达到了 500 mm²,经 HE 染色并在高倍镜观察肿瘤细胞,可以看到细胞核形状不规则且染色加深,并可见紊乱的核分裂象。Kim 等^[37]静脉注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉小鼠,将 5 μ L 未分化甲状腺癌细胞株(ARO、DRO、和 C643 细胞系)悬浮液注射到 8~12 周大的雄性 athymic 裸鼠的甲状腺或者侧腹中,适应性喂养两周后,用 CO₂ 吸入处死老鼠,并解剖检查肿瘤。发现所有裸鼠甲状腺中有明显的肿瘤细胞浸润,3 种细胞系均有 100% 的致癌性,其中注射 DRO 细胞系的裸鼠肺转移率很高,当癌细胞接种数量为 2.5×10^4 个/只时,肺转移率最高,为 80%。另测得原位甲状腺肿瘤微血管密度明显高于异位甲状腺肿瘤($P < 0.05$),原位肿瘤中促血管生成因子 VEGF 和 IL-8 的表达水平高于异位甲状腺肿瘤($P < 0.05$)。

异种移植甲状腺癌肿瘤模型造模迅速,移植瘤模型个体差异较小、接种成活率高、重复性良好;其中原位肿瘤模型的建立较为复杂,需要的手术技术较高,但能使癌细胞直接在起源器官中生长,有较高的外显率和再现转移性。

5 小结

甲状腺疾病动物模型的建立是研究甲状腺疾

病发病机制的关键方法,一个成功的动物模型不但要简便可行、重复性高,更需要准确地模拟疾病的发生、发展。在上述模型中,甲亢、甲减模型单纯停留在给药造模,提高或减少甲状腺激素合成,虽然快速高效,但它忽略了疾病复杂的发病过程如亚甲减到甲减这一过程,而 cDNA 免疫造模桥本甲状腺炎使修改 hTg cDNA 的基因序列成为可能,但该种方案技术不够成熟仍需进一步开发,甲状腺癌转基因模型的建立也为研发治疗甲状腺癌靶点药物研究提供了新思路。所以研究出一系列与疾病发展更贴切,操作更为便捷、经济,并且兼顾环境、遗传、肠道微生物、免疫等方面使其更能全面反映人类甲状腺疾病进展的动物模型是今后研究甲状腺疾病的重点之一。

参考文献:

- [1] 韩晴, 黄汉林. 甲状腺疾病影响因素研究进展 [J]. 中国职业医学, 2015, 42(3): 345-347, 350.
- [2] Tsai TY, Tu YK, Munir KM, et al. Association of hypothyroidism and mortality in the elderly population: a systematic review and meta-analysis [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2020, 105(6): 186.
- [3] Taylor PN, Albrecht D, Scholz A, et al. Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism [J]. Nat Rev Endocrinol, 2018, 14(5): 301-316.
- [4] Carlé A, Andersen SL, Boelaert K, et al. Management of endocrine disease: subclinical thyrotoxicosis: prevalence, causes and choice of therapy [J]. Eur J Endocrinol, 2017, 176(6): R325-R337.
- [5] Ragusa F, Fallahi P, Elia G, et al. Hashimoto's thyroiditis: Epidemiology, pathogenesis, clinic and therapy [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2019, 33(6): 101367.
- [6] Seib CD, Sosa JA. Evolving understanding of the epidemiology of thyroid cancer [J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2019, 48(1): 23-35.
- [7] Sun J, Hui C, Xia T, et al. Effect of hypothyroidism on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and reproductive function of pregnant rats [J]. BMC Endocr Disord, 2018, 18(1): 30.
- [8] Li J, Liu Z, Zhao H, et al. Alterations in atrial ion channels and tissue structure promote atrial fibrillation in hypothyroid rats [J]. Endocrine, 2019, 65(2): 338-347.
- [9] Lee JH, Lee M, Park JA, et al. Effects of hypothyroidism on serotonin 1A receptors in the rat brain [J]. Psychopharmacology (Berl), 2018, 235(3): 729-736.
- [10] Alayoubi A, Sullivan RD, Lou H, et al. *In vivo* evaluation of transdermal iodide microemulsion for treating iodine deficiency using sprague dawley rats [J]. AAPS PharmSciTech, 2016, 17(3): 618-630.
- [11] Hu Z, Zhuo X, Shi Y, et al. Iodine deficiency up-regulates monocarboxylate transporter 8 expression of mouse thyroid gland [J]. Chin Med J (Engl), 2014, 127(23): 4071-4076.
- [12] Jeddi S, Gholami H, Gheibi S, et al. Altered gene expression of hydrogen sulfide-producing enzymes in the liver and muscles tissues of hyperthyroid rats [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(10): 17937-17945.
- [13] Venediktova NI, Pavlik LL, Belosludtseva NV, et al. Formation of lamellar bodies in rat liver mitochondria in hyperthyroidism [J]. J Bioenerg Biomembr, 2018, 50(4): 289-295.
- [14] 刘树民, 崔晓旭, 陈平平, 等. 两种甲状腺功能亢进症动物模型的对比研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(7): 19-24, 3.
- [15] Braley-Mullen H, Yu S. NOD.H-2h4 mice: an important and underutilized animal model of autoimmune thyroiditis and Sjogren's syndrome [J]. Adv Immunol, 2015, 126: 1-43.
- [16] Braley-Mullen H, Sharp GC, Medling B, et al. Spontaneous autoimmune thyroiditis in NOD.H-2h4 mice [J]. J Autoimmun, 1999, 12(3): 157-165.
- [17] He X, Xiong C, Liu A, et al. Phagocytosis deficiency of macrophages in NOD.H-2h4 mice accelerates the severity of iodine-induced autoimmune thyroiditis [J]. Biol Trace Elem Res, 2018, 184(1): 196-205.
- [18] Verginis P, Stanford MM, Carayanniotis G. Delineation of five thyroglobulin T cell epitopes with pathogenic potential in experimental autoimmune thyroiditis [J]. J Immunol, 2002, 169(9): 5332-5337.
- [19] Hatzioannou A, Alevizaki M, Carayanniotis G, et al. Fine epitope mapping within the pathogenic thyroglobulin peptide 2340-2359: minimal epitopes retaining antigenicity across various MHC haplotypes are not necessarily immunogenic [J]. Immunology, 2012, 135(3): 245-253.
- [20] Wang X, Liu H, Zhang Y, et al. Effects of isolated positive maternal thyroglobulin antibodies on brain development of offspring in an experimental autoimmune thyroiditis model [J]. Thyroid, 2015, 25(5): 551-558.
- [21] 李叙颖, 张兰, 王琳, 等. 软坚消癭颗粒对肝郁脾虚型桥本甲状腺炎模型大鼠 Treg 和 Th17 细胞因子表达的影响 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2019, 45(3): 558-565.
- [22] Duan J, Deng T, Kang J, et al. DINP aggravates autoimmune thyroid disease through activation of the Akt/mTOR pathway and suppression of autophagy in Wistar rats [J]. Environ Pollut, 2019, 245: 316-324.
- [23] Fang Y, Chen K, Jackson DA, et al. Eosinophils infiltrate thyroids, but have no apparent role in induction or resolution of experimental autoimmune thyroiditis in interferon- γ -/-mice [J]. Immunology, 2010, 129(3): 329-337.
- [24] Lu QL, Bou-Gharios G, Partridge TA. Non-viral gene delivery in skeletal muscle: a protein factory [J]. Gene Ther, 2003, 10(2): 131-142.
- [25] Faustino LC, Li CW, Stefan-Lifshitz M, et al. A novel mouse model of autoimmune thyroiditis induced by immunization with adenovirus containing full-length thyroglobulin cDNA:

- implications to genetic studies of thyroid autoimmunity [J]. *Thyroid*, 2020, 30(9): 1338–1345.
- [26] Jacobson EM, Concepcion E, Ho K, et al. cDNA immunization of mice with human thyroglobulin generates both humoral and T cell responses; a novel model of thyroid autoimmunity [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19200.
- [27] Wolff JA, Budker V. The mechanism of naked DNA uptake and expression [J]. *Adv Genet*, 2005, 54: 3–20.
- [28] Decker RE, Lamantia ZE, Emrick TS, et al. Sonodelivery in skeletal muscle: current approaches and future potential [J]. *Bioengineering (Basel)*, 2020, 7(3): 107.
- [29] McIver B, Hay ID, Giuffrida DF, et al. Anaplastic thyroid carcinoma: a 50-year experience at a single institution [J]. *Surgery*, 2001, 130(6): 1028–1034.
- [30] Kirschner LS, Qamri Z, Kari S, et al. Mouse models of thyroid cancer: A 2015 update [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 421: 18–27.
- [31] Zheng X, Jia B, Song X, et al. Preventive potential of resveratrol in carcinogen-induced rat thyroid tumorigenesis [J]. *Nutrients*, 2018, 10(3): 279.
- [32] Dalke C, Hölzlwimmer G, Calzada-Wack J, et al. Differences in the susceptibility to iodine-131-induced thyroid tumours amongst inbred mouse strains [J]. *J Radiat Res*, 2012, 53(3): 343–352.
- [33] Pozdeyev N, Gay LM, Sokol ES, et al. Genetic analysis of 779 advanced differentiated and anaplastic thyroid cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(13): 3059–3068.
- [34] Knauf JA, Ma X, Smith EP, et al. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(10): 4238–4245.
- [35] McFadden DG, Vernon A, Santiago PM, et al. p53 constrains progression to anaplastic thyroid carcinoma in a Braf-mutant mouse model of papillary thyroid cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(16): E1600–E1609.
- [36] 张乐乐. 夏枯草提取物对甲状腺肿瘤的抑制作用 [D]. 郑州: 郑州大学, 2019.
- [37] Kim S, Park YW, Schiff BA, et al. An orthotopic model of anaplastic thyroid carcinoma in athymic nude mice [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(5): 1713–1721.

[收稿日期]2021-04-08

(上接第 65 页)

- [8] 梁娟, 刘越, 尹新华, 等. 异丙肾上腺素所致心肌损伤动物模型的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(1): 110–114.
- [9] 刘景艳, 朱亮, 蔡月琴, 等. 不同因素对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌梗死大模型建立影响的比较研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(5): 651–658.
- [10] 焦杰, 马星月, 傅强, 等. 延丹胶囊对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌缺血的作用及机制 [J]. *中成药*, 2021, 43(4): 908–913.
- [11] 王蓓, 童华诚, 张松. cTnT、NT-proBNP 及心肌酶谱联合检测在诊治急性冠脉综合征中的临床意义 [J]. *安徽医药*, 2014, 18(12): 2287–2289.
- [12] 杨铭华, 阚秀梅, 孙喜娟, 等. 肌钙蛋白 I、CK-MB 对癫痫持续状态患儿合并心肌损伤的诊断价值 [J]. *实用检验医师杂志*, 2014, 6(1): 38–40.
- [13] 王勃, 马亚萍, 金春华. 热性惊厥患儿心肌酶学变化与心肌损伤的关系 [J]. *山东医药*, 2009, 49(5): 99–100.
- [14] 周海文, 英锡相, 李海波. 牡荆素-2'-O-鼠李糖苷对大鼠急性心肌缺血的药效研究 [J]. *吉林中医药*, 2016, 36(1): 71–74.
- [15] Li C, Zhang Y, Wang Q, et al. Dragon's Blood exerts cardioprotection against myocardial injury through PI3K-AKT-mTOR signaling pathway in acute myocardial infarction mice model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 227: 279–289.
- [16] 刘炜, 沈春健, 高顺, 等. 探讨中性粒细胞与淋巴细胞比值对急性 ST 段抬高型心肌梗死合并多支血管病变近期临床预后的影响 [J]. *心脑血管病防治*, 2021, 21(2): 197–199.
- [17] Ong SB, Hernández-Reséndiz S, Crespo-Avilan GE, et al. Inflammation following acute myocardial infarction: multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 186: 73–87.
- [18] Karakas MS, Korucuk N, Tosun V, et al. Red cell distribution width and neutrophil-to-lymphocyte ratio predict left ventricular dysfunction in acute anterior ST-segment elevation myocardial infarction [J]. *J Saudi Heart Assoc*, 2016, 28(3): 152–158.
- [19] Kurtul A, Murat SN, Yarlioglu M, et al. Association of platelet-to-lymphocyte ratio with severity and complexity of coronary artery disease in patients with acute coronary syndromes [J]. *Am J Cardiol*, 2014, 114(7): 972–978.
- [20] 杨俊礼, 韩永燕, 王岩, 等. 血小板/淋巴细胞比值与急性一氧化碳中毒患者心肌损伤的关系 [J]. *广西医学*, 2017, 39(12): 1844–1846.

[收稿日期]2021-07-25