

两种甲状腺功能亢进症动物模型的对比研究

刘树民, 崔晓旭, 陈平平, 王可心, 汪娜, 柳长凤

(黑龙江中医药大学中医药研究院, 黑龙江中医药大学北药基础与应用研究省部共建教育部重点实验室, 哈尔滨 150040)

【摘要】 目的 复制两种甲状腺功能亢进症动物模型, 对比研究它们成型性及可持续性的异同, 为研究治疗甲亢的药物提供良好的评价载体。方法 优甲乐模型: 大鼠灌胃给予优甲乐 50 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 鼠重共 21 d, 于末次给药后第 1、7、14 天分别于眼底取血和接取尿液, 检测相关指标; 小肠结肠炎耶尔森氏菌模型: 大鼠尾静脉注射小肠结肠炎耶尔森氏菌, 于第 0、5、10、15、20 天共注射 5 次, 并于末次注射后第 5、15、25 天大鼠眼底取血和接取尿液, 检测相关指标。结果 优甲乐模型: 造模后 T₃、T₄、FT₃、FT₄ 显著升高, 但造模后 1 周即恢复正常, 尿液代谢的 PCA 图中显示模型组整体代谢网络偏离空白组, 2 周后恢复正常; 小肠结肠炎耶尔森氏菌模型: 造模后第 15 天和 25 天时 T₃ 和 T₄ 升高, 第 25 天时 TSH 显著升高, 尿液代谢的 PCA 图中模型组偏离空白组, 而第 15 天和 25 天时未回到空白组位置。结论 优甲乐甲亢模型成型性好但恢复迅速, 作为药效评价时适合预防给药; 而小肠结肠炎耶尔森氏菌甲亢模型成型性好并且持续性较好, 作为药效评价时可采取治疗给药方式。

【关键词】 甲状腺功能亢进症; 模型; 动物; 优甲乐; 小肠结肠炎耶尔森氏菌; 对比研究

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 07-0019-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.007.004

A comparative study of two hyperthyroidism models induced by *Yersiniaenterocolitica* and Euthyrox

LIU Shu-min, CUI Xiao-xu, CHEN Ping-ping, WANG Ke-xin, WANG Na, LIU Chang-feng
(Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine,
Key Laboratory of Chinese Material Medica and Ministry of Education, Harbin 150040, China)

【Abstract】 Objective To provide a good evaluation for research the hyperthyroidism drugs, two kinds of hyperthyroidism animal models were copied, and compared the similarities and differences of their formability and sustainability. **Methods** Euthyrox-induced model: The rat was taken Euthyrox (50 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g} - 1$ rat weight) for 21 d. And then the blood and urine were collected in 1 d, 7 d and 14 d after last time oral administration of Euthyrox; *Yersiniaenterocolitica*-induced model: the rats were injected *Yersiniaenterocolitica*(YE) in 0、5、10、15、20 (IOCV). And then the blood and urine were collected in 5d, 15d and 25d after last IOCV of YE. **Results** Euthyrox-induced model: T₃, T₄, FT₃, FT₄ were increased significantly, but returned normal 1 week later in the model group, PCA showed that model group deviated from the blank group, but recovered 2 weeks later; *Yersiniaenterocolitica*-induced model: T₃ and T₄ were increased significantly in 15 and 25 d, TSH significant raised in 25 d, the model group deviated from the blank group in PCA, and didn't return to the blank group in 15d or 25d. **Conclusion** Euthyrox-induced model has good formability but

【基金项目】 国家自然科学基金(81302898); 黑龙江省研究生创新科研项目(YJSCX2012-356HLJ); 黑龙江省青年科学基金(QC2012C038); 黑龙江中医药大学科研基金(B201104); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12541744)。

【作者简介】 刘树民(1963-), 男, 教授, 博士生导师, 主要研究方向: 中药药性理论及中药药效物质基础和作用机制研究。

【通讯作者】 柳长凤(1976-), 女, 副研究员, 博士, 主要研究方向: 中药药效物质基础和作用机制研究。

recovered quickly, which is suitable for prevention of drug delivery on efficacy evaluation; *Yersinia enterocolitica*-induced model with good formability and sustainability could be used for treatment of drug delivery on efficacy evaluation.

【Key words】 Hyperthyroidism; Model, animal; Euthyrox; *Yersinia enterocolitica*; Comparative study

甲状腺功能亢进症(简称甲亢)系指多种病因导致甲状腺功能增强,甲状腺激素分泌过所致的临床综合征^[1]。临床上主要有抗甲状腺药、手术、¹³¹I 辐射治疗等几种方式,但均有一定的禁忌症和副作用,近年来采用中医药治疗甲亢在临床上取得了较好的疗效,而复制出稳定可持续的甲亢动物模型对于开发有效的治疗甲亢的药物是必不可少的,药物治疗大致分为预防给药和治疗给药两种方式,对于持续性好的模型可以采用治疗给药的方式,但如果持续性不好即恢复较快的模型,采用治疗给药的方式起不到评价药效的作用,而应采用预防给药的方式,基于此,本文从较经典的造模方法中选取了两种造模方法:大鼠口服优甲乐^[2-3]和小肠结肠炎耶尔森氏菌尾静脉注射^[4-5]免疫造模,复制这两种甲亢动物模型,除常规的生化 and 病理指标检测外,引入代谢组学技术,利用液质检测模型尿液的代谢指纹图谱,从代谢的整体变化评价模型,通过此研究比较了两种不同方式复制模型的成型性及持续性,以期为研究治疗甲亢的药物提供良好的评价载体。

1 材料和方法

1.1 仪器

美国 Waters Acquity™ UPLC 液相色谱仪;美国 Waters LCT Premier XE 飞行时间质谱仪;DFM-96 型 16 管放射免疫 γ 计数器,合肥众成机电技术开发有限责任公司;CLASS TYPEB2 生物安全柜,北京东联哈尔仪器制造有限公司;DC-160HR 高速冷冻离心机,科大创新股份有限公司中佳分公司;HZQ-F160 振荡培养箱,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;DHP-9162 电热恒温培养箱,上海一恒科技有限公司。

1.2 试剂及制备方法

优甲乐(左甲状腺素钠片):德国默克公司,生产批号 147408,进口药品注册证 H20100528,规格 50 μg /片 \times 100 片;取优甲乐用蒸馏水配成浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混悬液;

小肠结肠炎耶尔森氏菌:由广东环凯微生物科技有限公司提供,菌株标准编号:FSCC234002,批号:A0121B,有效期至:2014/08/25;取小肠结肠炎耶尔森氏菌菌种复苏传代后,在液体培养基中培养

增菌,离心收集细菌沉淀后用 0.03% 甲醛溶液固定,最后用生理盐水制备成浓度为 5×10^8 个/mL 的细菌悬液;

放免试剂盒:潍坊三维生物工程集团有限公司, T3 批号 120815, T4 批号 130706, FT3 批号 130518, FT4 批号 130621; TSH 批号 130302,按说明书操作。

1.3 实验动物

SD 大鼠,雌性,体重 200 ± 20 g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(京)2007-0001】;动物实验在黑龙江中医药大学实验动物中心完成【SYXK(黑)2008-001】;大鼠于屏障环境动物室内标准条件下饲养,大鼠适应环境 1 周后开始试验。

1.4 动物模型的制备

1.4.1 优甲乐模型制备

取 SD 雌性大鼠 20 只,分为空白组和模型组,模型组灌胃给予优甲乐 50 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 鼠重,给药 21 d,空白组给予同等剂量的蒸馏水,于造模后第 1、7、14 天分别于眼底取血,全血样品于 4°C , 3000 r/min 离心 10 min,取血清于 -20°C 冷冻后待测,并于最后一次取血后取大鼠的甲状腺组织于 4% 甲醛溶液中固定;同时于代谢笼中接取第 1、7、14 天的 12 h 尿液,尿液样品于 4°C , 12000 r/min 离心 10 min,取上清液进 UPLC-MS 检测。

1.4.2 小肠结肠炎耶尔森氏菌模型制备

取 SD 雌性大鼠 20 只,分为空白组和模型组,模型组尾静脉注射 5×10^8 个/mL 的小肠结肠炎耶尔森氏菌细菌悬液免疫造模,注射时间为第 0、5、10、15、20 天共 5 次,给菌量分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL 依次增多,空白组给予等量的生理盐水造模,于末次注射后第 5、15、25 天大鼠眼底取血,全血样品于 4°C , 3000 r/min 离心 10 min,取血清于 -20°C 冷冻后待测,并于最后一次取血后取大鼠的甲状腺组织于 4% 甲醛溶液中固定;同时于代谢笼中接取末次注射后第 5、15、25 天的 12 h 尿液,尿液样品于 4°C , 12000 r/min 离心 10 min,取上清液进 UPLC-MS 检测。

1.5 检测项目及方法

1.5.1 常规指标检测

实验过程中观察大鼠的外观行为变化,监测体重,放免法检测血清 T3、T4、FT3、FT4、TSH 的水平(委托黑龙江中医药大学附属第一医院同位素放免室检测),HE 染色检查甲状腺病理改变。

1.5.2 UPLC-MS 检测尿液代谢数据

1.5.2.1 色谱条件

色谱柱:Acquity UPLC™ BEH C₁₈ column(50 mm × 2.1 mm i. d., 1.7 μm, Waters Corp, Milford, USA);流速 0.40 mL/min;柱温:25℃;样品仓温度:4℃;流动相:A 为 0.1% 甲酸水,B 为 0.1% 甲酸乙腈,梯度洗脱条件(表 1);色谱仪流出液不经分流直接注入质谱仪进行正离子扫描分析。

表 1 UPLC 梯度洗脱条件

Tab.1 UPLC gradient elution program

时间 Time(min)	A(%)	B(%)	洗脱曲线 (Curve)
Initial	98.0	2.0	-
8.0	60.0	40.0	6
10.0	2.0	98.0	6
13.0	0.0	100.0	6
14.0	98.0	2.0	6
17.0	98.0	2.0	6

1.5.2.2 质谱条件

电喷雾离子源(ESI),采用正离子扫描检测;毛细管电压扫描为 3000 V,样本锥孔电压为 35 V;分离锥孔电压为 3.0 V;离子源温度为 110℃;脱溶剂气温度为 350℃;准确质量校正采用亮氨酸-脑啡肽(leucine-enkephalin, [M+H]⁺ = 556.2771;扫描方式为全扫描,质量扫描范围 m/z100~1500。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 12.0 统计软件进行分析,各组数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用两

个独立样本 t 检验;尿液代谢数据利用 MassLynxV4.1 工作站进行 PCA 分析。

2 结果

2.1 大鼠外观行为

优甲乐模型:与空白组比较,模型组从第 14 天左右开始,出现烦躁不安、活动频繁、饮水量多,鼠笼内潮湿,排泄物增多,毛发无光泽;造模后一周基本恢复正常。

小肠结肠炎耶尔森氏菌模型:与空白组比较,模型组于造模后第 5 天开始,出现烦躁不安、活动频繁、饮水量多,鼠笼内潮湿,排泄物增多,毛发无光泽;至第 25 天时症状未见减轻。

2.2 体重

从表 2 可知,造模第 1 周,模型组体重出现负增长,与空白组比较有显著的统计学意义,第 2 周、第 3 周,虽与空白组比较无统计学意义,但直观数据观察可看出增长缓慢,待到造模结束后 2 周,体重增长恢复到正常水平。

从表 3 可知,造模的前 10 d 模型组体重增长缓慢,与空白组比较有显著性差异,第 10~20 天的时间段体重与空白组比较虽无统计学意义但增长缓慢,第 20~30 天的时间段体重差与空白组比较有统计学意义,第 30 天至实验结束模型组体重增长恢复正常。

2.3 生化指标结果

从表 4 可知,造模后大鼠血清 T3、T4、FT3、FT4 与空白组比较均具有显著性差异,恢复 7 d 的模型 T3、T4、FT3、FT4 均回到正常水平,而 TSH 与模型组比较无统计学意义。

表 2 优甲乐模型体重变化

Tab.2 Weight variation of Euthyrox model

组别 Groups	n	体重差值 Weight difference				
		7d-0d	14d-7d	21d-14d	28d-21d	35d-28d
空白组 Control group	10	32.67 ± 9.79	15.08 ± 8.72	14.12 ± 7.65	17.27 ± 10.12	16.23 ± 10.23
模型组 Model group	10	-4.47 ± 10.51*	8.84 ± 21.22	6.35 ± 6.21	20.23 ± 18.78	18.63 ± 14.67

注:与空白组比 * P < 0.05。

Note: * P < 0.05 compared with control group.

表 3 小肠结肠炎耶尔森氏菌模型体重变化

Tab.3 Weight variation of Yersiniaenterocolitica model

组别 Groups	n	体重差值 Weight difference				
		10d-0d	20d-10d	30d-20d	40d-30d	45d-40d
空白组 Control group	10	10.10 ± 8.17	6.40 ± 7.81	9.60 ± 4.12	7.50 ± 7.44	5.51 ± 5.45
模型组 Model group	10	2.60 ± 4.93*	3.91 ± 4.68	3.10 ± 5.07*	6.00 ± 4.29	4.50 ± 5.62

注:与空白组比 * P < 0.05。

Note: * P < 0.05 compared with control group.

表 4 优甲乐模型生化指标结果

Tab. 4 Biochemical index results of Euthyrox model

组别 Groups	n	T3 (nmol/L)	T4 (nmol/L)	FT3 (pmol/L)	FT4 (pmol/L)	TSH (uIU/mL)
空白组 Control group	10	1.36 ± 0.38	38.2 ± 17.18	1.81 ± 0.57	9.4 ± 2.56	0.86 ± 0.35
模型组 Model group	10	2.49 ± 0.57*	272.01 ± 65.06*	5.24 ± 2.33*	42.75 ± 7.70*	0.95 ± 0.24
模型组 7d Model group 7d	10	1.26 ± 0.32	42.42 ± 18.86	1.23 ± 0.21	11.82 ± 3.56	0.88 ± 0.55
模型组 14d Model group 14d	10	1.13 ± 0.59	34.28 ± 18.55	1.29 ± 0.43	7.58 ± 1.82	0.78 ± 0.31

注:与空白组比 * $P < 0.05$ 。

Note: * $P < 0.05$ compared with control group.

表 5 小肠结肠炎耶尔森氏菌模型生化指标结果

Tab. 5 Biochemical index results of Yersiniaenterocolitica model

组别 Groups	n	T3 (nmol/L)	T4 (nmol/L)	FT3 (pmol/L)	FT4 (pmol/L)	TSH (uIU/mL)
空白组 Control group	10	1.48 ± 0.29	39.74 ± 14.80	3.73 ± 1.00	7.88 ± 3.27	0.95 ± 0.43
模型组 5 d Model group 5 d	10	1.60 ± 0.29	49.33 ± 8.13	3.05 ± 0.50	9.57 ± 4.47	0.51 ± 0.31
模型组 15 d Model group 15 d	10	1.75 ± 0.28*	60.31 ± 18.32*	3.89 ± 0.96	9.20 ± 3.06	0.87 ± 0.57
模型组 25 d Model group 25 d	10	1.65 ± 0.32*	56.80 ± 14.68*	1.37 ± 0.66	5.35 ± 2.00	1.12 ± 0.36*

注:与空白组比 * $P < 0.05$ 。

Note: * $P < 0.05$ compared with control group.

从表 5 可知,造模后第 15 天时,模型组大鼠血清 T3 和 T4 与空白组比较有统计学意义,第 25 天时 T3 和 T4 与空白组比较仍有统计学意义,第 25 天时 TSH 与空白组比较有统计学意义。

2.4 病理

从彩插 3 图 1 中可知,空白组甲状腺滤泡大小基本一致,呈圆形或椭圆形,内充深红色染胶质,滤泡胶质染色均匀,滤泡间质无水肿,上皮细胞无增生;优甲乐模型组与空白组比较未见明显改变,而小肠结肠炎耶尔森氏菌模型组,甲状腺滤泡破坏,组织有血管侵犯,上皮细胞脱落,增生,间有大量结缔组织增生,少量的炎细胞存在。

2.5 代谢组学整体评价结果

大鼠尿液进 UPLC-MS 进行扫描检测,12 min 的 BIP 色谱图显示尿液样品得到了良好的分离效果(图 2),将各组的液相质谱色谱图利用 MassLynxV4.1 工作站进行 PCA 分析,得到反应各组组间离散程度的 Scores plot 图(图 3)。

从图中可能看出,优甲乐模型组造模后,模型

组与空白组比较明显的偏离空白组位置,表明造模后内源性代谢发生非常明显的改变,恢复期第 7 天时有回调的趋势但仍然与空白组无交叉,而到 14 d 时在得分图中与空白组重叠,表明模型基本恢复正常;小肠结肠炎耶尔森氏菌模型,造模后第 5 天、15 天和 25 天的代谢改变基本上一致,均与空白组无交叉,表明模型内源性代谢被扰动并且保持在一定的状态,说明此模型的持续性较好。

3 讨论

复制甲亢动物模型的方法主要有以下几种:(1)利用免疫方法构建诱发性甲亢动物模型,基本方法^[6]是利用表达 TSHR 的细胞或质粒 DNA 或腺病毒免疫小鼠,此方法复制的甲亢动物模型成为当前研究甲亢发病机制的首选模型,但此种方法动物模型复制繁琐,成模率不高;(2)利用外源性甲状腺素刺激造成高甲状腺素状态动物模型,此模型是模拟临床病症的造模方法,不能作为病理机制研究的模型,但此模型的特点是简单快速,成模率高,对于

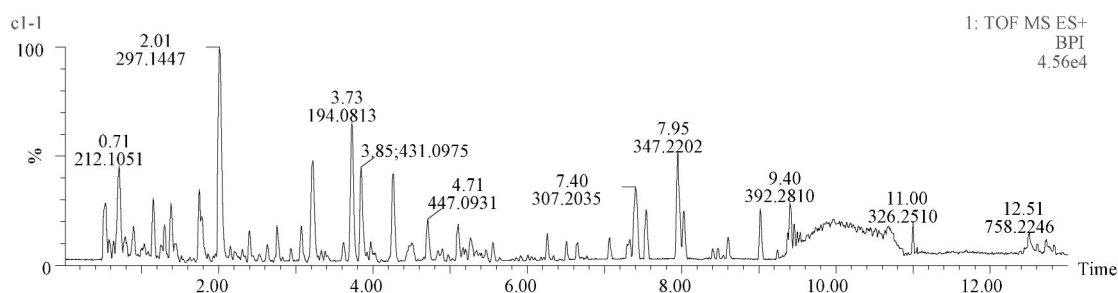
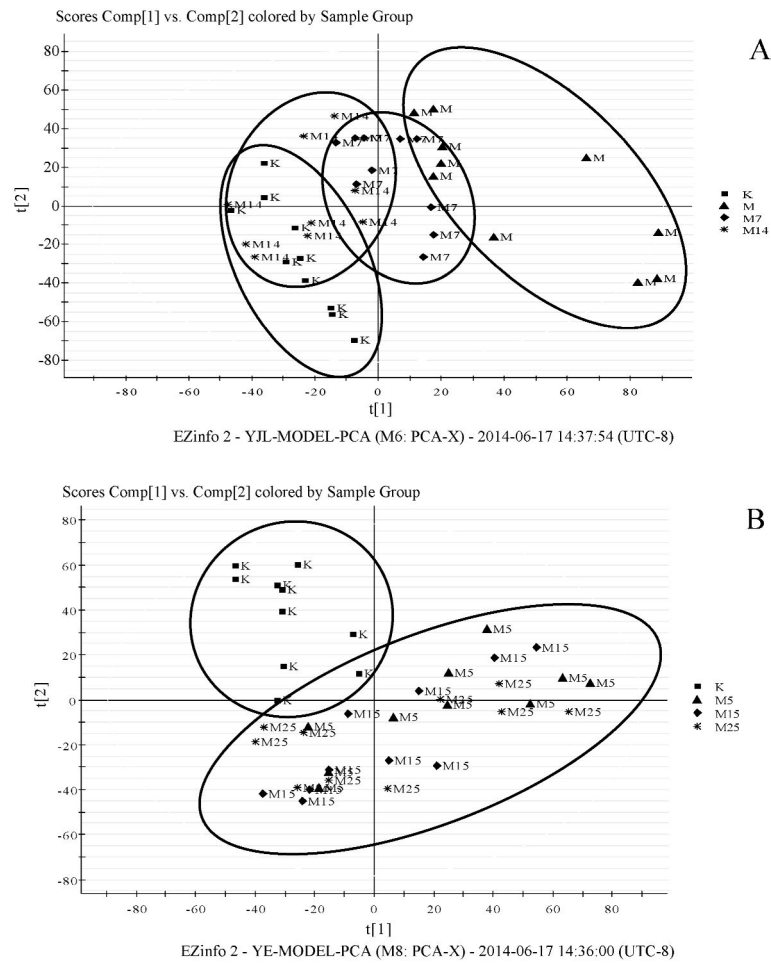


图 2 大鼠尿液 UPLC-MS 检测的 BPI 图

Fig. 2 BIP chromatograms of rats urine samples from UPLC-MS



注：A. 优甲乐模型 B. 小肠结肠炎耶尔森氏菌模型。

图 3 模型组与空白组比较的 Scores plot 图

Note: A. Euthyrox model group B. Yersinia enterocolitica model group.

Fig. 3 Scores plot of model and control groups from PCA

药物疗效的初步评价为首选模型。(3) 小肠结肠炎耶尔森氏菌免疫模型, 小肠结肠炎耶尔森氏菌是一种常见的感染因素, 相关研究^[7-9]表明小肠结肠炎耶尔森氏菌感染与甲亢的病情和复发率关系密切, 因此, 利用小肠结肠炎耶尔森氏菌尾静脉免疫复制模拟甲亢发病机制的动物模型, 成为当前较常用的甲亢动物模型。

对于评价和筛选治疗甲亢的药物及其疗效, 选择和复制合适的甲亢动物模型至关重要, 因此, 本文选取了大鼠口服优甲乐和小肠结肠炎耶尔森氏菌尾静脉免疫两种甲亢动物模型进行对比研究, 实验结果表明, 大鼠口服优甲乐造模后, 相关指标显示, 模型复制成功, 但 1 周后模型恢复至正常水平, 说明外源性给予甲状腺素的模型不具有持续性, 此模型的特点的简单快速, 成模率高。而尾静脉注射小肠结肠炎耶尔森氏菌后, 相关指标显示模型复制

成功, 并且模型持续近 1 个月, 这与临床甲亢的病程较长类似, 此模型的特点是复制较繁琐, 合适的菌液浓度及正规熟练的尾静脉注射对于成模至关重要。

本文采用常规指标并结合整体代谢变化综合评价了模型的成型性及持续性, 优甲乐模型为给予外源性甲状腺激素造成高甲状腺激素状态, 因此, 此模型的病理指标改变明显, 并且代谢组学结果也显示内源性代谢的改变明显, 此模型成型性好但持续性差, 对于药物疗效的初步评价为首选模型, 但要预防给药方能起到评价疗效的效果; 而小肠结肠炎耶尔森氏菌模型是模拟甲亢的发病机制, 是通过注射细菌后免疫而产生甲亢, 相关病理结果及代谢组学数据符合甲亢的临床病理表现, 虽不如优甲乐模型相关指标改变明显, 但此模型持续性较好, 用于评价药物的疗效可采用治疗给药的方式, 即成模

后再给药治疗,更符合临床上用药治疗的规律,此模型亦可作为疾病机制研究的模型。

参考文献:

- [1] 陈奇. 中药药效研究思路与方法 [M]. 人民卫生出版社, 2005:661.
- [2] 胡方林,刘仙菊,易法银,等. 内外合治对甲亢模型大鼠甲状腺激素及甲状腺病理改变的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2009,27(3):543 - 545.
- [3] 张子泰,侯英萍,汪静,等. 用左旋 T4 建立大鼠甲状腺功能亢进模型的实验研究 [J]. 西北国防医学杂志,2006,27(1):34 - 36.
- [4] 王庆浩,翟世伟,陈如泉. Graves 病大鼠甲状腺细胞中 MAKP 的表达及益气养阴中药对其影响 [J]. 天津中医药,2004,21(2):151 - 153.
- [5] 陶冬青,复方甲亢片对 Graves 病大鼠 T 细胞亚群及其细胞因子失衡影响的实验研究,博士学位论文 [D],2005.
- [6] 周瑾,李玉妹. Graves 病动物模型及 Graves 病发病机制的研究进展 [J]. 中国免疫学杂志,2010,26(8):758 - 763.
- [7] Corapçioğlu D, Tonyukuk V, Kiyani M, *et al.* Relationship between thyroid autoimmunity and *Yersinia enterocolitica* antibodies [J]. *Thyroid*. 2002 Jul,12(7):613 - 617.
- [8] Wang Z, Zhang Q, Lu J, *et al.* Identification of outer membrane porin f protein of *Yersinia enterocolitica* recognized by antithyrotropin receptor antibodies in Graves' disease and determination of its epitope using mass spectrometry and bioinformatics tools [J]. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010,95(8):4012 - 4020.
- [9] Hargreaves CE, Grasso M, Hampe CS, *et al.* *Yersinia enterocolitica* provides the link between thyroid-stimulating antibodies and their germline counterparts in Graves' disease [J]. *J Immunol*. 2013,190(11):5373 - 5381.

[修回日期]2014-05-26