孕期亚临床甲减大鼠模型的建立

于晓会, 刘爱华, 朱帅俊, 刘迪杰, 单忠艳, 滕卫平

中国医科大学附属第一医院内分泌科, 中国医科大学内分泌研究所, 辽宁省内分泌疾病重点实验室（辽宁 沈阳 110001）

摘要:目的 建立可靠的孕期亚临床甲减大鼠动物模型。**方法** 将 60 只成年雌性 Wistar 大鼠随机分为三组：①完全甲减组：手术完全切除甲状腺；②亚临床甲减组：手术完全切除甲状腺后，予 L-T_4 微渗泵 1.0μg/（100g·d）浓度持续皮下泵入，自怀孕第 15 天剂量改为 1.05μg/（100g·d）；③正常对照组：行甲状腺假手术。各组大鼠在基础状态、孕前和怀孕后第 10、13、17 天和分娩当天采血测定甲状腺功能。**结果** 各组大鼠在基础状态时，血清 TSH 和 TT_4 水平无统计学差异。完全甲减组大鼠在孕前和整个怀孕过程中及分娩当天血清 TSH 水平始终明显高于亚临床甲减组和正常对照组（都有 $P<0.01$），血清 TT_4 水平始终明显低于其他两组（都有 $P<0.01$）。亚临床甲减组大鼠在孕前和整个怀孕过程中及分娩当天血清 TSH 水平始终明显高于正常对照组（都有 $P<0.05$），血清 TT_4 水平始终与正常对照组相当（都有 $P>0.05$）。**结论** 应用手术完全切除甲状腺，再予微渗泵皮下持续输入合适剂量的 L-T_4 可以成功建立孕期亚临床甲减大鼠模型。

关键词:亚临床甲状腺功能减退症；孕期；大鼠模型；微渗泵

Establishment of animal model of pregnant rat with subclinical hypothyroidism

中图分类号：R581.2　　文献标识码：B

基金:高等学校博士学科点专项科研基金（项目编号：20092104120003）

作者简介:于晓会（1978- ），女，辽宁省瓦房店市人，博士研究生，副教授、副主任医师，研究方向是甲状腺疾病的流行病学和实验研究。

通讯作者:滕卫平 Email：twp@vip.163.com

YU Xiao-hui, LI Si-qi, ZHU Shuai-jun

The Endocrine Institute and The Liaoning Provincial Key Laboratory of Endocrine Diseases, Department of Endocrinology and Metabolism, The First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China

Abstract:Objective To establish the animal model of pregnant rat with subclinical hypothyroidism. **Methods** 60 female adult Wistar rat were divided into three groups: (i) overt hypothyroidism (OH) group: total removal of the rats' thyroid. (ii) subclinical hypothyroidism (SCH) group: after total removal of the rats' thyroid, levothyroxine were given to the rats by miniosmotic pumps and the rate was 1.0μg/(100g·d). (iii) control group: the false thyroid surgery was carried out. The serum samples were collected from all the three groups at baseline, preconception, 10^{th}, 13^{th}, 17^{th} gestational days and at delivery. Thyroid function was detected at all the time points. **Results** At baseline, thyroid function indexes levels were similar among the three groups. After thyroid surgery, TSH levels of OH group were always higher than those of SCH group and control group (all $P<0.01$). And TT_4 levels were always lower than those of other two groups (all $P<0.01$). In SCH group, from preconception to delivery serum TSH levels were always higher than those of control group (all $P<0.05$). Serum TT_4 levels were always similar with those of control group (all $P>0.05$). **Conclusion** After total removal thyroid and optimal dose of levothyroxine infusion with miniosmotic pump, a successful animal model of pregnant rat with subclinical hypothyroidism can be established.

Key words: Subclinical hypothyroidism; Pregnancy; Rat model; Miniosmotic pump

亚临床甲减是妊娠期最常见的甲状腺疾病之一，患病率约为2%-5%[1,2]。近年来，越来越多的研究证实妊娠期亚临床甲减可以引起早产、流产、胎盘早剥等不良妊娠结局的发生增加[3-5]，还可以使后代的智力发育水平出现不同程度的下降[6-7]。但是，具体的机制尚不清楚。因此，建立亚临床甲减特别是孕期亚临床甲减的动物模型为深入研究妊娠期亚临床甲减对妊娠不良结局及后代神经智力发育影响的机制提供了基础。

1 材料与方法

1.1 动物分组

选取60只SPF级雌性Wistar大鼠，体重180~200克（购自北京维通利华实验动物技术有限责任公司，饲养于中国医科大学实验动物部SPF级动物饲养中心）。将60只Wistar大鼠随机分成3组（每组n=20）：①完全甲减组；②亚临床甲减组；③正常对照组。

1.2 动物模型的制备

① 完全甲减鼠（OH组）模型：动物称重后，10%水合氯醛（3ml/kg）腹腔注射麻醉。仰卧固定于手术板上，颈部备皮后，75%酒精局部消毒处理，铺巾。从胸骨向前行颈正中切口，长度1.5～2.0cm，切开颈部皮肤，钝性分离皮下组织，在中线将覆盖于器官的结缔组织与舌骨形肌肉钝性分离，暴露甲状腺。用眼科镊从气管处依次分离甲状腺峡部和左、右叶甲状腺，术中避免损伤喉返神经和颈动静脉。局部生理盐水冲洗，无菌纱布擦干术野。1号线行肌肉和皮肤分层缝合切口。术后恢复1个月之后，皮下等量注射生理盐水。10天后与正常雄鼠合笼交配。当雌鼠阴道涂片镜下发现精子确定为妊娠0天，记为E0。

② 亚临床甲减鼠（SCH 组）模型：参照 Escobar-Morreale HF[8]的方法制作亚临床甲减动物模型。前面步骤同完全甲减组。甲状腺切除术恢复 1 个月之后，当雌鼠体重稳定在 200 克左右时，将微渗泵（osmotic minipump，ALZET®，Alza）植入甲减鼠背部皮下，L-T_4 装入泵中，以 1.0μg/（100g·d）浓度持续泵入。10 天后测定甲状腺功能，当血清 TSH 高于正常、而 TT_4 水平在正常范围时，提示非孕期亚临床甲减鼠建模成功。

非孕期亚临床甲减模型建立成功后，与正常的雄鼠合笼交配，雌：雄=2：1，当雌鼠阴道涂片镜下发现精子确定为妊娠 0 天，记为 E0。在 E0 至 E15，继续予 L-T_4 0.95μg/（100g·d）持续皮下注射，自 E15 天始 L-T_4 剂量调整为 1.05μg/（100g·d），持续输注至仔鼠出生，将分娩当日定为 P0 天。

大鼠饲料为普通大颗粒饲料（由实验动物中心提供），按每 200g 标准体重大鼠每天进食 15g 干饲料计算，限量分笼投食，自由饮水。为防止由于甲状旁腺的摘除而导致的低钙抽搐，完全甲减组和亚临床甲减组大鼠术后饮水中均加入 0.1%的乳酸钙。

③ 正常对照鼠（C 组）：进行假手术，仅手术切开颈部暴露甲状腺，不切除甲状腺。术后恢复 1 个月，皮下等量注射生理盐水。10 天后与正常雄鼠合笼交配。

1.3 血清甲状腺功能指标的测定

非孕期大鼠采用剪尾取血，孕期母鼠分别于 E10、E13、E17、P0（每日龄各 15 只）眶后静脉丛取血，分离血清，采用固相化学酶免疫分析法（ICMA 法）测定血清 TSH、TT_4。试剂盒从美国 DPC 公司购入。TT_4 测定的灵敏度为 1μg/dL。TSH 批内 CV 1.12～3.85%，批间 CV 1.63～3.93%，TT_4 批内 CV

1.23～3.56%，批间 CV 2.48～5.67%。

1.4 统计学处理

数据采用 SPSS 16.0 统计学软件进行处理、分析，所有数据均采用均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。两组数据的均数的比较采用独立样本 *t* 检验，多组数据均数的比较采用方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时期体重的变化

各组大鼠基础状态时平均体重在各组间无统计学差异。OH 组和 SCH 组大鼠经甲状腺切除手术及植入微渗泵等处理后，在怀孕前体重明显低于同期处理的 C 组大鼠（均 $P<0.01$）；在整个怀孕期间，包括 E10、E13、E17 和 P0 时，OH 组和 SCH 组大鼠的体重仍显著低于 C 组（均 $P<0.01$）；E10 和 E13 时，OH 组大鼠的体重与 SCH 组大鼠无统计学差异；E17 和 P0 时，SCH 组大鼠的体重明显高于 OH 组（$P<0.05$）。（表 1）

表 1 各组大鼠不同时期体重的变化

分组	例数	非孕期		孕期			
		基础	孕前	E10	E13	E17	P0
OH 组	15	203.3±9.7	204.4±21.5**	212.2±10.3**	224.2±12.7**	239.2±12.7**##	254.6±19.0**##
SCH 组	15	200.2±8.7	206.7±15.8**	217.7±20.9**	232.7±19.9**	262.7±15.9**	283.4±10.2**
C 组	15	204.2±9.4	243.0±6.5	259.7±32.4	276.7±26.4	297.7±30.5	312.6±35.1

注：与同时点 C 组比较，**：$P<0.01$；与同时点 SCH 组比较，##：$P<0.01$。

2.2 各组大鼠不同时期血清 TSH 和 TT_4 水平的变化

各组大鼠基础状态下，血清 TSH 水平和 TT_4 水平无统计学差异。OH 组大鼠在孕前、E10、E13、E17 和 P0 时血清 TSH 水平均明显高于 SCH 组和 C 组（都有 $P<0.01$），TT_4 水平均明显低于同时点 SCH 组和 C 组大鼠（都有 $P<0.01$）。SCH 组大鼠经处理后，在孕前、E10、E13、E17 和 P0 血清 TSH 水平明显高于 C 组（$P<0.05$），TT_4 水平始终与对照组相当（$P>0.05$）。（表 2）

表 2 各组大鼠不同时期血清 TSH 和 TT4 水平的变化（$\bar{x}\pm s$）

分组	例数	非孕期		孕期			
		基础	孕前	E10	E13	E17	P0
TSH（mIU/L）							
OH 组	15	0.092±0.045	5.030±1.178**##	2.893±1.675**##	2.525±1.832**##	2.694±1.214**##	3.031±1.060**##
SCH 组	15	0.088±0.018	0.874±0.253*	0.812±0.337*	0.932±0.416*	0.768±0.462*	0.864±0.436*
C 组	15	0.091±0.023	0.083±0.035	0.081±0.016	0.075±0.019	0.073±0.020	0.082±0.018
TT_4（pmol/L）							
OH 组	15	3.913±1.012	0.477±0.148**##	0.492±0.141**##	0.448±0.036**##	0.528±0.153**##	0.592±0.105**##
SCH 组	15	4.122±0.985	3.225±0.999	4.024±1.584	3.624±1.584	4.024±1.584	3.458±1.082
C 组	15	4.05±0.542	3.513±1.032	4.388±1.568	3.468±2.113	4.254±1.338	3.022±0.674

注：与同时点 C 组比较，**：$P<0.01$；与同时点 SCH 组比较，#：$P<0.05$。

讨 论

近年来，妊娠早期亚临床甲减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、优生学学界的广泛关注[9-10]。妊娠期亚临床甲减引起后代脑发育损伤的机制目前尚不清楚。由于受人体标本来源的限制，目前有关甲状腺激素影响后代脑发育机制的研究资料多来自动物实验，其中大鼠是最常使用的动物。目前可以通过三种方法建立甲减动物模型，第一种：应用抗甲状腺药物如甲巯咪唑或丙基硫氧嘧啶处理大鼠，获得甲减动物。第二种：应用碘缺乏的饲料喂养大鼠，从而获得碘缺乏致甲减的大鼠模型。第三种：手术切除母鼠甲状腺，再植入 L-T_4 微渗泵，依 L-T_4 的剂量不同，制作不同程度的甲减模型。由于抗甲状腺药物和碘缺乏在造成母鼠甲减的同时都可能影响胚胎发育，所以手术切除甲状腺、再植入 L-T_4 微渗泵建立的亚临床甲减孕鼠模型，被认为是比较理想的模型。

大鼠脑发育过程和人类较为相似，新生大鼠脑发育相当于 5～6 个月胎儿；生后 7 天相当于足月胎儿，15～21 日龄大鼠相当于婴幼儿期，但其整个脑发育过程所需时间较人脑发育时间要短。迄今为止，已经明确了人类和大鼠孕期与甲状腺激素相关的主要事件发生的对应时间。例如，在人类妊娠第 8 周，羊膜腔和体腔可以检测到 T_3、T_4，在大鼠这种变化发生在孕第 10 天；人类妊娠第 12 周，T_3 受体（T_3R）在胚胎大脑表达，大鼠发生在孕第 13 天；人类妊娠在 18～20 周，胎儿甲状腺功能完全建立，大鼠为孕第 17.5～18 天[11]。因此大鼠是研究人类脑发育缺陷机制的理想的动物。

胎儿的甲状腺自妊娠 12 周开始分泌甲状腺激素，妊娠 18~20 周下丘脑-垂体-甲状腺轴的功能建立，甲状腺功能成熟[12]。甲状腺激素促进脑发育可分为三

个阶段[13]：第一阶段是妊娠的前 20 周。大脑主要部分和脑干大部分的神经发生都在此阶段内完成，表现为神经元的倍增、移行。此时，胎儿甲状腺功能（Fetal thyroid function，FTF）尚未建立，脑发育依赖的甲状腺激素完全来源于母体。第二阶段是妊娠的后 20 周。在这个时期，重要的神经元都将发育成熟，轴突延伸，突触形成旺盛。此阶段脑发育所需的甲状腺激素主要来源于胎儿自身甲状腺，母体提供的甲状腺激素仅作为补充。第三阶段是出生后。完成神经胶质的发育，轴突的髓鞘化，小脑神经元继续增殖、移行和分化，直到脑发育成熟。此时只有小儿自身的甲状腺激素起作用。

本实验中采用手术切除甲状腺、再植入 L-T_4 微渗泵建立的亚临床甲减孕鼠模型，选择与人类甲状腺开始发育、甲状腺轴功能发育成熟以及与人类脑发育重要时间点相对应的时间检测孕期大鼠血清 TT_4、TSH 水平，以确定孕期亚临床甲减大鼠是否制作成功。当血清 TT_4 在正常范围内而 TSH 升高时，提示模型制备成功。本研究的结果提示在完全切除 Wistar 大鼠甲状腺后，予孕前大鼠 L-T_4 微渗泵　1.0μg/（100g・d），可以获得非孕期亚临床甲减的大鼠。当大鼠怀孕后，在 E15 天前仍然维持原输入剂量不变，E10 和 E13 的结果提示此时处理后的 SCH 组大鼠的血清 TT_4 水平与对照组相当，而血清 TSH 水平明显高于对照组，提示此阶段大鼠仍然维持为亚临床甲减状态。在大鼠的孕期过程中，体重的增长非常迅速，由于怀孕期间特殊的生理变化，机体对于甲状腺激素的需要量较孕前明显增加，因此在 E15 时，我们将 L-T_4 的剂量调整为 1.05μg/100g・d。通过对 E17 和 P0 的检测，我们发现该剂量可以保持大鼠为亚临床甲减状态至分娩。

因此，本研究成功的制作了孕期亚临床大鼠的模型，这为今后进行孕期亚

临床甲减对后代脑发育影响的机制研究提供了基础。

（致谢：感谢高等学校博士学科点专项科研基金（项目编号：20092104120003）项目的资助）

参考文献

1. Lazarus JH, Bestwick JP, Channon S, et al. Antenatal thyroid screening and childhood cognitive function[J]. N Engl J Med, 2012, 366(6): 493-501.
2. Potlukova E, Potluka O, Jiskra J, et al. Is age a risk factor for hypothyroidism in pregnancy? An analysis of 5223 pregnant women[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2012, 97(6): 1945-1952.
3. Benhadi N, Wiersinga WM, Reitsma JB, et al. Higher maternal TSH levels in pregnancy are associated with increased risk for miscarriage, fetal or neonatal death[J]. Eur J Endocrinol, 2009, 160(6): 985-991.
4. Wang S, Teng WP, Li JX, et al. Effects of maternal subclinical hypothyroidism on obstetrical outcomes during early pregnancy[J]. J Endocrinol Invest, 2012, 35(3): 322-325.
5. Negro R, Schwartz A, Gismondi R, et al. Increased pregnancy loss rate in thyroid antibody negative women with TSH levels between 2.5 and 5.0 in the first trimester of pregnancy[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(9): e44-e48.
6. Haddow JE, Palomaki GE, Allan WC, et al. Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child[J]. N Engl J Med, 1999, 341(8):549-555.

7. Li Y, Shan Z, Teng W, et al. Abnormalities of maternal thyroid function during pregnancy affect neuropsychological development of their children at 25-30 months[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2010,72(6):825-829.
8. Escobar-Morreale HF, del Rey FE, Obregón MJ, et al. Only the combined treatment with thyroxine and triiodothyronine ensures euthyroidism in all tissues of the thyroidectomized rat[J]. Endocrinology, 1996, 137(6): 2490-2502.
9. Abalovich M, Amino N, Barbour LA, et al. Management of thyroid dysfunction during pregnancy and postpartum: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92(8 suppl):S1-S47.
10. Stagnaro-Green A, Abalovich M, Alexander E, et al. Guidelines of the american thyroid association for the diagnosis and management of thyroid disease during pregnancy and postpartum[J]. Thyroid, 2011, 21(10):1081-1125.
11. Chan S, Kachilele S, McCabe CJ, et al. Early expression of thyroid hormone deiodinases and receptors in human fetal cerebral cortex[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2002, 138(2): 109-116.
12. Contempré B, Jauniaux E, Calvo R, et al. Detection of thyroid hormones in human embryonic cavities during the first trimester of pregnancy[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1993, 77(6): 1719-1722.
13. Anderson GW, Schoonover CM, Jones SA. Control of thyroid hormone action in the developing rat brain[J]. Thyroid, 2003,13(11):1039-1056.