

## Graves 病母鼠分娩后甲状腺自身抗体水平的观察

余月<sup>1</sup>, 王曙<sup>2</sup>, 石星<sup>1</sup>, 朱子阳<sup>1</sup>, 王旭<sup>1</sup>, 郭梅<sup>3</sup>, 刘倩琦<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学附属南京儿童医院内分泌科, 江苏 南京 210008, <sup>2</sup>上海交通大学医学院附属瑞金医院内分泌科, 上海 200025, <sup>3</sup>南京医科大学第四临床医学院儿科研究所, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的: 建立 Graves 病小鼠模型, 研究 Graves 病母鼠分娩后甲状腺自身抗体水平变化。方法: 应用表达促甲状腺激素刺激激素受体(thyrotropic-stimulating hormone receptor, TSHR) A 亚单位的重组腺病毒 Ad-TSHR-289 免疫雌性 Balb/c 小鼠制备 Graves 病动物模型。将 6 周 Balb/c 雌性小鼠随机分为实验组、对照组, 分别用重组 Ad-TSHR-289、Ad- $\beta$ -gal 经小鼠腿部肌肉注射, 免疫剂量均为  $3.3 \times 10^8$  pfu/50  $\mu$ l PBS, 每隔 3 周免疫 1 次, 共 3 次。免疫结束后, 内眦静脉取血, 检测血清甲状腺素(T4)、促甲状腺素受体抗体(TRAb), 然后分别与 Balb/c 雌性小鼠配对, 确定妊娠后继续饲养至分娩。分娩后 1 d, 处死母鼠, 检测母鼠血清 T4、TRAb、抗甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)、甲状腺球蛋白抗体(TGAb), 并分离母鼠甲状腺, 行组织学检查。结果: 实验组中 96.7% 的母鼠血清 TRAb 水平显著增高 ( $P < 0.05$ ); 实验组第 3 次免疫后有 56.7% (17 只) 的小鼠达到甲亢标准, 分娩后 73.3% (22 只) 的母鼠达到甲亢标准; 实验组中 16.7% 的母鼠血清 TPOAb 水平明显高于正常范围; 母鼠血清 TGAb 较对照组显著增高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论: 利用 Ad-TSHR-289 免疫 Balb/c 小鼠可以成功制备 Graves 病小鼠模型。分娩后 Graves 病母鼠血清 TPOAb 及 TGAb 水平升高可能与 TRAb 有关。

**[关键词]** Graves 病; 甲状腺自身抗体; 动物模型; 分娩后

**[中图分类号]** R581.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)07-928-05

## Autoantibodies in post-partum mice with Graves' disease

YU Yue<sup>1</sup>, WANG Shu<sup>2</sup>, SHI Xing<sup>1</sup>, ZHU Zi-yang<sup>1</sup>, WANG Xu<sup>1</sup>, GUO Mei<sup>3</sup>, LIU Qian-qi<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pediatric Endocrinology, Nanjing Children's Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210008; <sup>2</sup>Department of Endocrinology, Ruijin Hospital Affiliated to School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025; <sup>3</sup>Institute of Pediatrics, the Fourth Clinic Medicine School of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To illustrate the influence of "autoantibodies" in a post-partum period of a Graves' disease animal model. **Methods:** Female Balb/c mice aged 6 weeks were randomly divided into experimental group and control group, and injected intramuscularly with Ad-TSHR-289 ( $3.3 \times 10^8$  pfu/50  $\mu$ l PBS) and control adenovirus (Ad- $\beta$ -gal  $3.3 \times 10^8$  pfu/50  $\mu$ l PBS) respectively, three times at 3 weeks intervals. When the immunization was over, both groups were mated with male mice after getting a bit of serum from venae angularis for measurement of TRAb titer and T4 level. The mice were sacrificed 1 day after delivery, blood and thyroids were obtained. T4 level was detected by radio immunoassay. Levels of TRAb, TPOAb, TGAb were detected by electrochemiluminescence immunoassay. The thyroids were used for histological examination. **Results:** TRAb positive rates were 96.7% in experiment group ( $P < 0.05$ ). The incidence of hyperthyroidism in mice after delivery was 73.3%, which was higher than that after the 3rd immunization (56.7%). TPOAb positive rates were 16.7% in experiment group. The titre of TGAb in experiment group increased significantly higher than that in control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** An animal model of Graves' disease is successfully prepared by immunization with Ad-TSHR-289. The TRAb maybe involved in the increase of TPOAb and TGAb in post-partum mice with Graves' disease.

**[Key words]** Graves' disease; autoantibodies; animal model; post-partum

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(7): 928-932]

**[基金项目]** 江苏省高校自然科学研究计划第二批项目 (07KJD320144)

\*通讯作者, E-mail: qqliu1129@hotmail.com

Graves 病是最常见的自身免疫性甲状腺疾病, 临床表现为甲状腺功能亢进和高代谢征候群, 并伴有血清甲状腺激素(T4)增高和促甲状腺激素受体

抗体(TRAb)增高,但是至今还没有自发免疫的Graves病动物,更多的是予甲状腺素片灌胃来建立甲亢模型,这仅能引起T4升高,并不能使甲状腺相关抗体产生变化。近年来有很多学者致力于建立Graves病动物模型,并研究其相关机制。本研究拟应用表达促甲状腺激素刺激激素受体(thyrotropic-stimulating hormone receptor, TSHR) A亚单位的重组腺病毒(Ad-TSHR-289)免疫小鼠,建立雌性Graves病小鼠模型,研究该模型分娩后甲状腺自身抗体水平的变化,为进一步研究Graves病母亲对子代甲状腺结构及功能的影响提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Ad-TSHR-289和表达 $\beta$ -半乳糖的重组腺病毒(Ad- $\beta$ -gal)分别由上海交通大学王曙教授和美国加州大学Chen Chunrong教授提供。

健康清洁级Balb/c小鼠:雌性40只,6周龄;雄性40只,6周龄,用于配对,与雌鼠同时饲养。将雌性Balb/c小鼠随机分成实验组( $n=30$ )和对照组( $n=10$ ),分笼饲养,饲养条件符合清洁级实验动物的设施标准。

碘[ $^{125}\text{I}$ ]T4放射免疫分析试剂盒(天津九鼎医学生物工程有限公司);TRAb、抗甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)、甲状腺球蛋白抗体(TGAb)检测试剂盒(美国罗氏诊断产品有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 Ad-TSHR-289和Ad- $\beta$ -gal扩增纯化

将Ad-TSHR-289病毒液感染293细胞,收获病变细胞混悬液后,于 $-80^\circ\text{C}$ 和 $37^\circ\text{C}$ 冻融3次,离心,取上清,经过 $\text{CsCl}_2$ 密度梯度离心法纯化,用 $\text{TCID}_{50}$ 法测定病毒感染性滴度为 $5 \times 10^{10}$  pfu/ml。Ad- $\beta$ -gal扩增纯化同前,病毒感染性滴度为 $4.8 \times 10^{10}$  pfu/ml。将病毒液于 $-80^\circ\text{C}$ 保存。

#### 1.2.2 免疫小鼠

实验组雌性Balb/c小鼠30只,免疫剂量为Ad-TSHR-289  $3.3 \times 10^8$  pfu/50  $\mu\text{l}$  PBS;对照组10只,免疫剂量为Ad- $\beta$ -gal  $3.3 \times 10^8$  pfu/50  $\mu\text{l}$  PBS。经腿部肌肉注射,每隔3周免疫1次,共3次。第3次免疫结束后,按雌雄比例1:1分笼配对,次日晨发现雌鼠阴道栓者定为妊娠0.5 d,然后继续饲养至分娩。在实验过程中,无Balb/c小鼠死亡。

#### 1.2.3 标本采集

第3次免疫后,经小鼠内眦静脉取血200  $\mu\text{l}$

分离血清,用于TRAb以及T4检测。分娩后1 d,眼球取血,分离血清用于甲状腺自身抗体和T4测定;处死母鼠,分离甲状腺组织,4%多聚甲醛固定。

#### 1.2.4 血清T4、TRAb、TPOAb和TGAb检测

采用放射免疫法测定母鼠血清T4。采用电化学发光法测定母鼠血清TRAb、TPOAb、TGAb水平。

#### 1.2.5 甲状腺组织学检查

4%多聚甲醛固定甲状腺组织后,经梯度酒精脱水,石蜡包埋切片,HE染色,于显微镜下观察并摄片。

### 1.3 统计学方法

所有数据均采用SPSS13.0统计软件处理,T4、TPOAb值用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,统计采用 $t$ 检验,TRAb、TGAb值统计采用Mann-Whitney U秩和检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 实验组与对照组甲状腺大体及组织病理学表现

大体标本可见实验组甲状腺体积较对照组明显增大(图1)。光镜下,对照组母鼠甲状腺滤泡上皮细胞呈扁平状,中等大小,排列整齐,滤泡中胶质含量丰富(图2)。而实验组66.7%(20只)母鼠甲状腺呈明显增生改变,甲状腺滤泡上皮细胞增多、变大呈高立方形,排列紧密,滤泡形态不规则,胶质较少,少许滤泡中有乳头状结构向滤泡内生长,滤泡间组织水肿,可见散在淋巴细胞浸润(图2)。

### 2.2 第3次免疫后实验组与对照组小鼠血清T4和TRAb水平比较

以对照组(10只)T4平均值 $\pm 3s$ 为正常范围,以超过正常上限作为诊断甲亢的标准<sup>[1]</sup>。实验组29只(96.7%)小鼠血清T4水平较对照组显著性增高( $P < 0.05$ )。其中17只小鼠达到甲亢标准,发病率为56.7%(图3)。对照组(10只)血清TRAb值均 $< 0.3$  IU/L,实验组(30只)血清TRAb均 $> 0.3$  IU/L。对两组进行Mann-Whitney U秩和检验, $Z = -4.723$ , $P < 0.01$ ,差异有统计学意义。

### 2.3 分娩后实验组与对照组母鼠T4、TRAb、TPOAb和TGAb水平比较

同样以对照组(10只)T4平均值 $\pm 3s$ 为正常范围,以超过正常上限作为诊断甲亢的标准。实验组(30只)母鼠血清T4水平较对照组显著性增高(图4A, $P < 0.05$ )。其中22只母鼠达到甲亢标准,发病率为73.3%。对照组(10只)血清TRAb值均 $< 0.3$  IU/L,对两组进行Mann-Whitney U秩和检验, $Z = -4.726$ ,

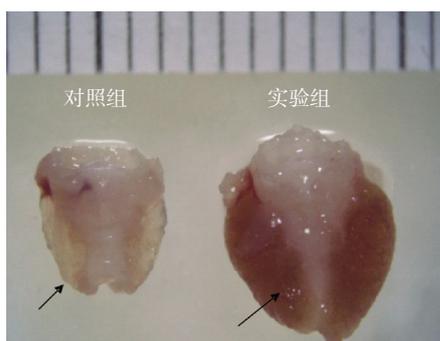


图 1 两组甲状腺标本大体观  
Figure 1 Thyroid gland of mice in two groups

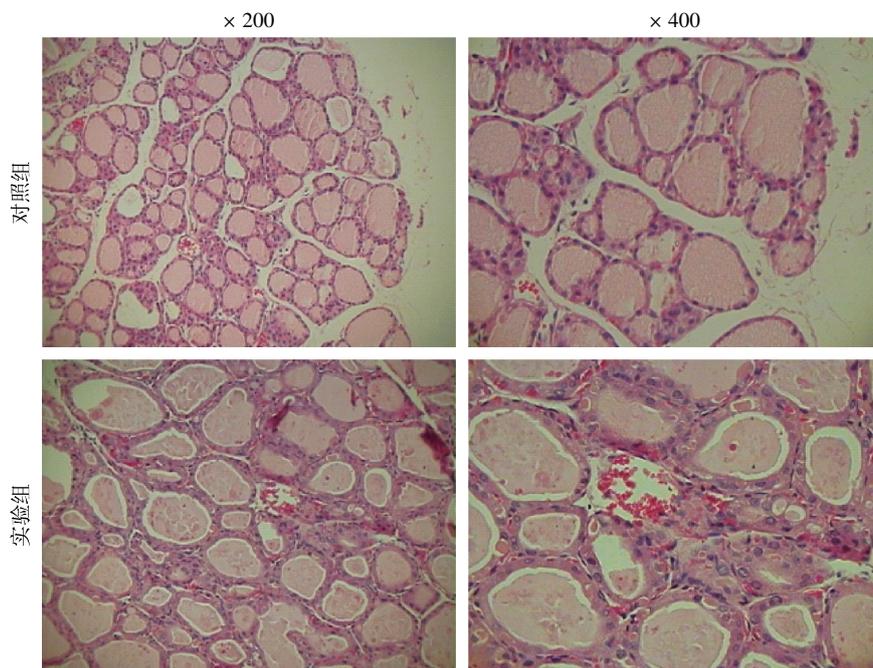


图 2 2 组甲状腺组织病理学观察(HE 染色)  
Figure 2 Pathological observation of the thyroid glands under light microscope (HE staining)

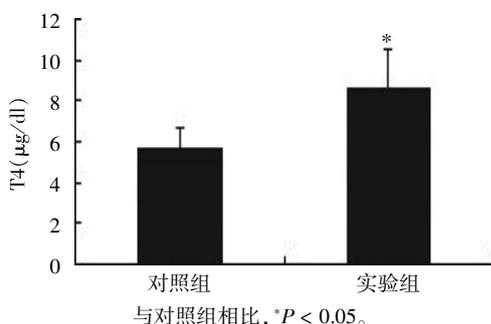


图 3 第 3 次免疫后小鼠血清 T4 水平  
Figure 3 Serum T4 in control and experiment groups after the 3rd immunization

和 TGAbs。TRAb 是 Graves 病患者血清中存在的针对 TSHR 的特异性自身抗体,该抗体在患者血清中的阳性检出率在 80% 之上。根据功能不同可分为 3 类:①促甲状腺素受体刺激性抗体(TSAb),②促甲

状腺素刺激阻断性抗体(TBAb),③中性促甲状腺素受体抗体。  
 $P < 0.01$ , 差异有统计学意义。实验组(30 只)TPOAb 水平明显高于对照组(10 只), 差异有统计学意义(图 4B,  $P < 0.05$ ), 5 只(16.7%)的血清 TPOAb 水平明显高于正常范围。对照组(10 只)血清 TGAbs 值均  $< 10$  IU/L, 对两组进行 Mann-Whitney U 秩和检验,  $Z = -2.922$  得  $P < 0.01$ , 差异有统计学意义。

### 3 讨论

甲状腺自身抗体是自身免疫性甲状腺疾病免疫异常的标志, 临床上的检测指标有 TRAb、TPOAb

状腺素刺激阻断性抗体(TBAb), ③中性促甲状腺素受体抗体。

Graves 病动物模型的首次报道是, 将转染人类 TSHR 的 cDNA 及 MHC II 类分子的成纤维细胞注射到 AKR/N 鼠体内, 诱发约 25% 的鼠产生 TRAb, 并产生甲亢(高 T4、弥漫性甲状腺肿及甲状腺细胞增生), 从此, 人类对 Graves 病动物模型的研究上升到了新的阶段。目前, 造模成功率较高的方法为利用表达全长 TSHR 或者 TSHR A 亚单位的重组腺病毒免疫 Balb/c 雌性小鼠。Nagayama 等<sup>[2]</sup> 使用 Ad-TSHR 免疫 Balb/c 小鼠, 50% 小鼠产生 TRAb, 并且引起甲状腺毒症。Chen 等<sup>[3]</sup> 研究发现, TSHR 在细胞内可分解为与 TSH 结合的胞外 A 亚单位和跨膜或胞质信号转导的 B 亚单位, A 亚单位可从细胞表面脱落下来。脱落的 A 亚单位是引起 Graves 病的主要

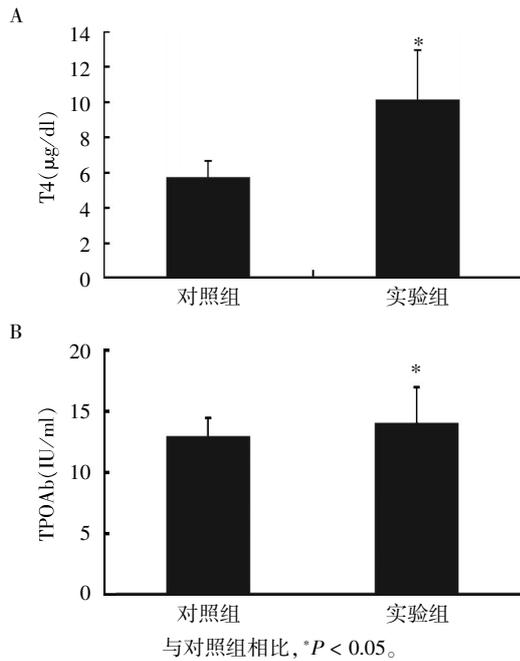


图 4 两组母鼠分娩后血清 T4(A)和 TPOAb(B)水平  
Figure 4 Serum T4 and TPOAb in control and experiment groups at post-partum

自身抗原。TSAb 优先与脱落的 A 亚单位结合<sup>[4]</sup>。因此,在诱发 Graves 病甲亢方面,使用表达 A 亚单位的 Ad-TSHR-289 比全长 Ad-TSHR 更有效,能使 70% Balb/c 小鼠产生甲亢<sup>[5]</sup>。

临床研究发现,0.1%~0.4%的妊娠合并甲状腺功能亢进症中,85%为 Graves 病<sup>[6-7]</sup>。妊娠合并甲亢可对孕产妇、胎儿和新生儿产生不良影响,如发生流产、早产、死胎、低出生体重儿、新生儿甲状腺疾病等。母亲还容易合并贫血、妊娠高血压综合症、充血性心力衰竭及甲状腺功能亢进危象等。由于妊娠期母体免疫状态的改变,自身免疫性甲状腺病会给孕妇及胎儿造成很大的影响。甲状腺自身抗体阳性的母亲在妊娠时期低甲状腺素血症或即使仅存在甲状腺特异性抗体等,都会影响胎儿的精神神经发育,同时增加流产、早产和低出生体重儿的危险性<sup>[8]</sup>。若孕母甲状腺功能不正常,婴儿甲状腺功能异常的概率也增加<sup>[9]</sup>。妊娠早期母体 TPOAb 和 TGAb 阳性是胎儿围产期死亡的危险因素,并且独立于甲状腺激素水平<sup>[10]</sup>。Stagnaro-Green 等<sup>[11]</sup>研究发现,甲状腺自身抗体 TPOAb 和 TGAb 滴度在妊娠后随孕期逐渐下降,分娩后反跳性增高。

本研究利用 Ad-TSHR-289 免疫 Balb/c 小鼠,第 3 次免疫后通过内眦静脉采血,测定实验组中有 96.7%(29 只)小鼠 TRAb 水平显著增高,成模率达 56.7%(17 只)。妊娠至分娩后,该组中 73.3%(22 只)

母鼠达到甲状腺功能亢进症标准,血清 T4 水平明显高于正常范围。甲状腺组织病理切片显示 66.7%(20 只)的母鼠甲状腺呈明显的增生改变,并有乳头状折叠形成,7 只有淋巴细胞浸润。造模成功率与 Nagayama 和 Chen 等<sup>[2-3]</sup>的报道接近。实验组中分娩后原有的 96.7%(29 只)小鼠 TRAb 水平仍显著增高,分娩后 Graves 病动物模型成模率较第 3 次免疫后成模率高,由 17 只增加到 22 只。这可能是妊娠对造模有直接影响,蒲丹等<sup>[12]</sup>的研究也证实这一观点,Balb/c 小鼠制备 Graves 病动物模型辅以妊娠,成模率将显著增加。

本研究进一步测定了分娩后实验组和对对照组血清 TPOAb 及 TGAb 的水平,实验组 16.7%(5 只)血清 TPOAb 水平明显高于正常范围,血清 TGAb 较对照组有显著差异。分娩后母鼠血清 TPOAb 及 TGAb 水平与对照组相比,有显著性差异。有学者指出,TPOAb 和 TGAb 是紧接着 TRAb 之后的二次免疫,淋巴细胞浸润表明了 TPOAb 和 TGAb 免疫反应的范围和程度<sup>[13]</sup>。在 Balb/c 母鼠的 Graves 病程中,TRAb 可能在甲状腺相关抗体的产生过程中起主导作用,淋巴细胞浸润可能促使免疫反应向针对过氧化物酶、甲状腺球蛋白的方向发展。TGAb 和 TPOAb 的存在反映甲状腺自身免疫状态的存在,是维持自身免疫炎症、使疾病呈慢性特征的关键因素。

在配对、妊娠过程中,实验母鼠均受孕,且顺利生下子鼠,这可能与妊娠期间 Th2 型细胞因子的作用占优势,将母体对胎儿的细胞免疫反应降低到最小,以维持胎儿-母体同种异体的共存所致。而由妊娠诱发的变化下调了 Th1 介导的反应,使 Graves 病母鼠的病情在妊娠期间得到暂时性的缓解。由于胎儿携带母体和父体双方的主要组织相容性抗原复合物,母体对胎儿会发生免疫排斥。为了保护胎儿,母体免疫系统采取免疫抑制。因此,在妊娠期间自身免疫性疾病可能出现短暂的病情缓解期,而分娩之后免疫反跳又会使自身免疫性疾病加重。

正常妊娠与免疫系统的复杂变化密切相关,这在很大程度上影响了自身免疫性疾病的临床表现和对子代的影响。但是目前妊娠和分娩后 Graves 病自身免疫进程及机制尚有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 伍丽萍,施秉银,郭丽英,等. 在雌性小鼠制备 Graves 病动物模型 [J]. 中华内分泌代谢杂志,2006,22(4): 388-391
- [2] Nagayama Y, Kita-Furuyama M, Ando T, et al. A novel

murine model of Graves' hyperthyroidism with intramuscular injection of adenovirus expressing the thyrotropin receptor[J]. *J Immunol*,2002,168(6):2789-2794

[3] Chen CR, Pichurin P, Nagayama Y, et al. The thyrotropin receptor autoantigen in Graves' disease is the culprit as well as the victim [J]. *J Clin Invest*,2003,111(12):1897-1904

[4] Brown RS. Autoimmune thyroid disease;unlocking a complex puzzle[J]. *Curr Opin Pediatr*,2009,21(4):523-528

[5] Chen CR, Pichurin P, Chazenbalk GD, et al. Low-dose immunization with adenovirus expressing the thyroid-stimulating hormone receptor A-subunit deviates the antibody response toward that of autoantibodies in human Graves' disease[J]. *Endocrinology*,2004,145(1):228-233

[6] Chan GW, Mandel SJ. Therapy insight;management of Graves' disease during pregnancy [J]. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*,2007,3(6):470-478

[7] 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):S1-47

[8] Gartner R. Thyroid diseases in pregnancy [J]. *Lurr Opin Obstet Gynecol*,2009,21:501-507

[9] Fu J, Jiang Y, Liang L, et al. Risk factors of primary thyroid dysfunction in early infants born to mothers with autoimmune thyroid disease[J]. *Acta Pediatr*,2005,94(8):1043-1048

[10] Maanisto T, Vaarasmaki M, Pouta A, et al. Perinatal outcome of children born to mothers with thyroid dysfunction or antibodies;a prospective population-based cohort study [J]. *J Clin Endocrinol Metab*,2009,94(3):772-779

[11] Stagnaro-Green A, Roman SH, Cobin RH, et al. A prospective study of lymphocyte-initiated immunosuppression in normal pregnancy;evidence of a T-cell etiology for postpartum thyroid dysfunction [J]. *J Clin Endocrinol Metab*,1992,74(3):645-653

[12] 蒲丹, 郭辉, 马爱群, 等. 胎儿微嵌合体对 Graves 病动物模型制备的影响[J]. *西安交通大学学报(医学版)*,2009,30(3):331-334

[13] McLachlan SM, Nagayama Y, Pichurin PN, et al. The link between Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis;a role for regulatory T cells [J]. *Endocrinology*,2007,148(12):5724-5733

[收稿日期] 2012-01-04

## 第一届分子影像学齐鲁国际论坛征文通知

第一届分子影像学齐鲁国际论坛暨第三届山东省分子影像学学术大会定于 2012 年 9 月 21~24 日在烟台市召开,届时将邀请众多国际、国内著名专家作专题报告,并进行多种形式的学术交流。现开始征文,欢迎广大医学影像工作者及相关学科研究人员踊跃投稿及参会。

**一、征文内容** 以分子影像学相关研究内容为主:各种分子影像学成像新技术;分子探针制备;分子影像学实验和临床初步应用;药物靶向治疗和随访;分子影像学管理和质量控制及其他影像医学、分子生物学等方面的论著、讲座、述评、综述、短篇报道、病例讨论。

**二、征文要求** 应征论文未在其他正式刊物上发表,具有科学性、先进性、实用性、重点突出;文字表述准确。提供中英文摘要(目的、方法、结果、结论)和全文;鼓励英文投稿,将单独出版英文版论文集并送美国 CPCI-S 数据库;截稿日期为 2012 年 8 月 1 日。

**三、投稿方式** 本次会议采用 E-mail 投稿;E-mail: [molecularimage@bzmc.edu.cn](mailto:molecularimage@bzmc.edu.cn) ; 会议网址: <http://www.bzmc.edu.cn> 投稿请注明姓名、作者单位、详细通信地址、邮政编码、手机号码及 E-mail(需要大会发言请注明)。

主办单位:滨州医学院,《磁共振成像》杂志社