

自身免疫甲状腺疾病及其并发症模型 研究与比较*

张 爽¹, 杨宇峰¹, 臧凝子², 石 岩¹, 李 品^{1,2**}

(1. 辽宁中医药大学研究生学院 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学附属医院 沈阳 110847)

摘 要:自身免疫性甲状腺疾病(Autoimmune thyroid disease, AITD)是一种常见的器官特异性自身免疫性疾病,其病理特征为甲状腺球蛋白抗体(Thyroglobulin antibody, TgAb)和/或甲状腺过氧化物酶抗体(Thyroid peroxidase antibody, TPOAb)滴度显著增高,并伴有甲状腺组织内淋巴细胞浸润等病理表现。本病发病率逐年升高,发病机制复杂,并发症如桥本脑病、不孕不育或流产、相关肾病等,危害较大,因此本病已成为本领域的研究热点之一。动物模型对疾病基础研究有着至关重要的作用。近年来,众多学者通过不同动物模型揭示了AITD的病因病机、并发症及中西医治疗干预机制等。本文通过整理分析近年来AITD及其并发症小鼠模型的动物选择、具体造模方法和模型评价,为AITD基础实验研究选择合理的动物模型提供参考。

关键词:自身免疫甲状腺疾病 自身免疫甲状腺疾病并发症 动物模型 造模方法

doi: 10.11842/wst.20231218004 中图分类号: R-332 文献标识码: A

自身免疫性甲状腺疾病(Autoimmune thyroid disease, AITD)是T细胞介导的器官特异性自身免疫性疾病,以甲状腺球蛋白抗体(Thyroglobulin antibody, TgAb)和/或甲状腺过氧化物酶抗体(Thyroid peroxidase antibody, TPOAb)滴度升高为特征,包括Graves病(Graves disease, GD)、桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis, HT)、产后甲状腺炎(Postpartum thyroiditis, PPT)等。流行病学调查显示,我国AITD患病率约为5%,正常成人妇女中TPOAb和(或)TgAb阳性率分别为14.17%和14.71%^[1-2]。目前发病率逐年升高,但机制尚未完全明确,主要与遗传易感性、微量元素缺乏、环境触发因素之间的相互作用有关。本病不仅对甲状腺自身功能造成影响,也会对其他器官功能产生影响,如桥本脑病、不孕或流产、相关肾病等,产生这些并发症的原因与其他器官特异性

或全身性自身免疫性疾病有关,因此仍需在机制研究中进行探索以寻求治疗突破点。目前中西医学者均开展了大量的研究工作,本文将对自身免疫甲状腺疾病及其并发症的造模方法、模型评价、中西互参等方面作出归纳阐述,为今后模型研究提供参考。

1 发病机制研究

1.1 自身免疫甲状腺疾病的中西医发病机制

1.1.1 西医发病机制

发病机制是动物造模模拟的重要方向,也为模型评价提供依据。AITD的特征表现是甲状腺淋巴细胞浸润致使滤泡细胞损伤、腺体破坏导致甲减;或激活甲状腺细胞上的甲状腺素受体(TSHR),使甲状腺抗体水平升高导致甲亢^[3]。目前AITD已知的发病机制

收稿日期:2023-12-18

修回日期:2024-03-28

* 国家自然科学基金委员会青年科学基金项目(82104755):基于“脾滋胎气”补脾益气法靶向PD-1/PD-L1通路调节蜕膜巨噬细胞极化干预TAI合并流产机制研究,负责人:李品;中国博士后科学基金71批面上资助项目(2022MD713767):基于“脾主运化、在体合肌”理论参苓白术散激活AMPK调控铁死亡改善T2DM肌少症疗效机制研究,负责人:李品。

** 通讯作者:李品(ORCID:0000-0002-1588-0544),博士,副主任医师,主要研究方向:中西医结合防治内分泌疾病。

主要包括:①免疫调节基因和甲状腺特异性基因通过改变中枢、外周耐受机制以及T淋巴细胞和抗原呈递细胞之间的相互作用,来调控AITD的进程^[4]。②细胞因子失衡可导致甲状腺上皮细胞生长、分化异常和免疫功能紊乱,进而改变Th1/Th2免疫活性细胞的状态,诱发AITD^[1]。③微量因素通过增加甲状腺免疫球蛋白的免疫原性、调节T、B淋巴细胞增殖分化等方式,参与AITD的进程^[5-7]。

1.1.2 中医发病机制

传统医学认为,AITD属于“瘰病”,病机为气、痰、郁搏结于颈前,责之于肝、脾二脏。肝胆疏泄失常,肝气郁滞,津液内停,酿生痰湿;脾气虚弱,运化失司,内生痰湿,气、痰、郁随气上升搏结于颈前而成瘰病。综上,不同的脏腑功能失调,临床表现不同,中医干预方向也不同,因此确保科学合理的中医药研究,其病证结合的模型选择尤为重要。

1.2 自身免疫甲状腺疾病并发症的中西医发病机制

1.2.1 桥本氏脑病

(1)西医发病机制:桥本氏脑病(Hashimoto's encephalopathy, HE)的发病机制主要包括血管炎、自身抗体和激素失调3个方面。AITD中所改变的主要甲状腺抗原均在人脑中表达。①抗甲状腺球蛋白抗体(anti-TgAb)和抗甲状腺过氧化物酶抗体(anti-TPOAb)可与脑血管和脑细胞发生自身免疫反应,干扰中枢神经系统的个体发育和功能,导致血管炎或脑细胞损伤^[8-9]。② α -烯醇化酶N端抗体作为HE特异性生物标志物,可通过增加促炎细胞因子的产生,改变多种脑神经元回路,诱发HE^[10]。③甲状腺功能障碍使过量的T3发挥小胶质细胞的促炎和吞噬行为作用,诱导中枢神经系统异常免疫,发生HE^[11]。

(2)中医发病机制:中医认为,肝郁脾虚,气郁痰结为HE的基本病机。AITD起病日久,肝郁脾虚,内生浊毒,肝风引动,上犯清窍,致使气血阻滞,郁不外达,痰热瘀结,蒙蔽清窍。

1.2.2 不孕不育或流产

(1)西医发病机制:甲状腺自身抗体(Anti-thyroid antibodies, ATA)阳性是导致不孕不育或流产的主要机制。AITD通过诱导T细胞功能紊乱和母胎免疫耐受失衡两种途径,对女性生殖功能产生不良影响。①ATA阳性流产患者体内的CD3⁺/CD4⁺细胞比值增高,促使Th1细胞介导的免疫反应增多,发生排斥反应,干扰胚胎着床^[12-13]。②甲状腺自身免疫可引起母体-胎儿界面的免疫系统活动失调,子宫内膜免疫环境发生改变,子宫内膜容受性降低,影响胚胎着床^[13]。

(2)中医发病机制:中医学中脾有“孕育之源”之称,具有运化、升清和抵御外邪的生理功能。脾失运化,气血乏源,胞宫及冲任督脉受损;脾气不升,失于固摄,胎失所附;脾失之卫,卫不固表,外邪侵袭胞胎。

1.2.3 AITD相关肾病

(1)西医发病机制:免疫因素是AITD相关肾病最常见的发病机制。由免疫机制引起的肾病可分为:①肾小球基底膜上的甲状腺微粒体抗原和甲状腺球蛋白抗体可介导免疫复合物形成,常见的病型为膜性肾病^[14]。②血清TgAb、TPOAb作为参与膜性肾病发病机制的免疫复合物,在AITD相关肾病患者体内的水平显著高于仅有肾病的患者^[15]。

(2)中医发病机制:中医认为,先天之本不足,阴阳失调为AITD相关肾病的主要病机。肾虚不能化精,水液代谢障碍,则痰凝瘀结于颈部。段素静等^[16]发现,AITD肾虚证患者中所测的TgAb、TPOAb及肾上腺皮质功能水平与中医肾虚证候关系密切。

2 自身免疫甲状腺疾病的造模

2.1 模型动物选择

1976年,出现首例通过小鼠胸腺切除术诱导的实验性自身免疫甲状腺炎(Experimental autoimmune thyroiditis, EAT)模型,该种类型的甲状腺炎在术后几个月自发发生,存在稳定性差、成模率低、花费时间长

表1 实验常用小鼠的优势及适用研究

鼠类	优势	适用的研究
NOD.H-2h4小鼠	非常类似于人类的自身免疫性甲状腺炎	自发性甲状腺炎模型的研究
Lewis大鼠	对环境变化较敏感,血清内含有高水平的甲状腺素,自身免疫反应明显	自身免疫相关疾病的研究
CAJ/CBA小鼠	乳腺自发性肿瘤发生率较高	肉芽肿性实验性自身免疫甲状腺炎的研究
C57小鼠	补体活性高,容易诱发免疫耐受性	转基因鼠模拟人类的基因缺陷类疾病研究
SD大鼠	抗病能力及适应性强,对性激素敏感性高,价格较低	诱发性肿瘤模型研究
Wistar大鼠	生长发育快,抗病能力强且价格较低	甲状腺抗原诱导实验性自身免疫性甲状腺炎的研究

的缺点^[17]。随后,Wick等^[18]建立了OS鸡EAT模型,从病理学和临床特征角度来看与HT表现相似并常呈现多基因遗传特征。1988年,免疫佐剂结合自身甲状腺免疫法开始被众多学者使用,研究显示,该方法造模大鼠的抗甲状腺球蛋白反应类似于桥本约90%的患者^[19]。甲状腺球蛋白(Thyroglobulin, Tg)是动物与人类共同的甲状腺自身抗原,常选用鼠Tg和猪Tg注射到鼠类体内造模HT动物模型^[20]。自2007年后,HT动物造模几乎均选用鼠类,其操作技术也越来越成熟。

2.2 桥本甲状腺炎造模

桥本甲状腺炎为AITD最常见类型,临床中常见甲功正常期、甲亢期、甲减期,不同分期临床表现差异较大。由于小鼠的遗传基因与人类高度相似,并具有成本低、易繁殖的特点,因此常被用来研究桥本甲状腺炎患者的发病机制。本病造模方法相对成熟,但不同的动物种属、干预方法、研究需求,在造模选择上有所区别,下面根据AITD合并甲功不同分期予以造模总结。

2.2.1 自身免疫甲状腺功能正常模型

(1)异源性甲状腺抗原免疫法:异源性甲状腺抗原免疫法通常用Tg配合佐剂在遗传易患甲状腺炎的小鼠中发生免疫应答,产生TPOAb、TgAb等自身抗体,使甲状腺淋巴细胞浸润,建立EAT模型。Tg为AITD患者中的主要自身抗原,占甲状腺总蛋白的75%~80%。异源性甲状腺球蛋白包含鼠Tg、猪Tg和牛Tg,而小鼠的品系分类可分为易感类(H-2^s, H-2^b)和耐药类(H-2^r, H-2^d, H-2^b)。易感类菌株检测的34种Tg肽中有17种具有促甲状腺作用,而在耐药类菌株检测的10种Tg肽中,有1种菌株可诱导EAT^[21]。因此,研究中常选用NOD小鼠进行皮下多点注射诱导AITD。Wang等^[22]在NOD小鼠尾部皮下注射完全弗氏佐剂,14天后注射同剂量的不完全弗氏佐剂,造模周期49天,结果显示模型组甲状腺滤泡破坏,甲状腺组织中淋巴细胞浸润,血清T3、T4、TSH水平正常。此种造模方式的优点是操作方法易获得、造模方法简单、造模周期较短、成功率较高,对研究遗传因素的作用机制具有明显的优势,并能完全模拟自身免疫性甲状腺炎的发病,缺点是成本高、饲养环境要求严格。

(2)单纯碘剂诱导法:长期摄入过量碘会诱发AITD,一部分原因是高碘化Tg具有强免疫原性,可引发针对甲状腺的免疫反应;另一部分原因是过量碘摄

入增加了细胞间黏附分子-1(ICAM-1)在甲状腺细胞上的表达,引发单核细胞浸润和炎症加速^[23]。以上两点因素在NOD.H-2h4小鼠建立的模型中得到了充分的证明。碘进入甲状腺细胞后,通过甲状腺过氧化酶的酶促作用插入Tg分子中,增强活性氧触发ICAM-1的转录,促进AITD的自身免疫过程^[24]。Teng等^[25]在NOD.H-2h4小鼠饮用水中加入不同浓度的碘化钠,分别于实验开始后4、8、16、24周观察各项指标,实验结果表明,补碘剂量与淋巴细胞浸润、抗原抗体反应、造模成功率呈正相关。同时也提示,剂量的选择要根据实验需求确定补碘剂量,过量补碘是不安全的,碘的营养水平应控制在正常范围内。此种造模方式的优点是成模率高、模型较稳定,缺点是周期较长,造模过程中若出现小鼠死亡情况,会耗费大量经费与时间。

2.2.2 自身免疫性甲减模型

桥本甲状腺炎患者中,约50%患者在病程后期会演变为甲状腺功能减退^[26]。在动物实验中,实验性自身免疫性甲减模型的造模方法有脾细胞体外活化移植免疫法、异源性甲状腺抗原免疫法和重组TSH多肽免疫法等。

(1)体外活化移植免疫法:脾细胞体外活化移植免疫法是由小鼠甲状腺球蛋白(mTg)介导的脾细胞经mTg和白介素(IL)活化后过继转移所诱导,适用于肉芽肿性自身免疫性甲状腺炎模型。该种过继转移模型是研究各种细胞和炎症介质在诱导和解决自身免疫性炎症中作用的实验模型,在第20天使甲状腺淋巴细胞达到最大浸润,第60天让小鼠甲状腺病变的炎症缓解或进展为纤维化,发生自身免疫性甲减^[27]。此种造模方法小鼠的甲状腺淋巴细胞浸润较其他方法建立的模型更为严重,并伴有肉芽肿性改变。

(2)免疫佐剂配合碘剂诱导法:造模HT动物模型的免疫佐剂一般为弗氏佐剂,具有促进抗原产生高效价抗体,延长抗原受刺激的作用。碘剂能够促进甲状腺滤泡细胞凋亡,两者相结合,HT模型效果更明显。刘雅楠^[28]第1天给造模大鼠皮下多点注射完全弗氏佐剂,分别于第14、21、28天多点注射不完全弗氏佐剂,并在造模期间喂养500 mg·L⁻¹碘化钠。结果显示,模型组大鼠甲状腺淋巴细胞浸润,滤泡结构广泛破坏,TPOAb、TgAb浓度升高,TSH浓度升高,FT3、FT4浓度降低。Cui等^[29]指出碘浓度的增加与EAT模型成功率及炎症程度呈正相关,Tg与高碘免疫对自身抗体水平

升高具有协同作用。此种造模方式成模率高且稳定,可重复性高,并且诱导实验性自身免疫性甲状腺炎的效果更明显,但注射部位、开始诱导的起始时间及碘剂的浓度不同,结果也不同。

(3)重组 TSHR 多肽免疫法:TSHR 为诱发 AITD 的主要自身抗原,使用 TSHR 胞外段羧基端蛋白诱导机体产生 TRAb 抗体,抑制 TSH 与 TSHR 结合,使甲状腺细胞分泌的 T₃、T₄ 浓度降低,进而产生甲减的一系列症状,可用来模拟自身免疫甲减疾病的发生。岳瑞宏^[30]选用不同浓度 TSHR-c 蛋白免疫小鼠,每 2 周免疫 1 次,共 4 次,结果显示 TRAb 阳性,血清 T₄ 水平下降。该种造模方法具有检测时间短的优点,但技术难度要求高、成功率较低、应用较少。

(4)异源性甲状腺抗原免疫法:本方法可随着甲状腺损伤程度,进一步出现甲功降低的症状。因此在小鼠的选择上与自身免疫甲状腺功能正常模型有所不同。赵树君^[31]选用易感的 CAJ/CBA 小鼠、Lewis 大鼠和非易感的 Balb/c 小鼠、Wistar 大鼠进行 EAT 造模,研究得出,Lewis 大鼠的 TPOAb 和甲状腺炎症反应最明

显。TPOAb 作为双重活性位点酶,与 AITD 的发展密切相连^[32]。因此,鼠系的选择对实验也是至关重要的。

2.2.3 自身免疫性甲亢模型

自身免疫性甲亢是由自身免疫反应造成甲状腺滤泡结构破坏,导致甲状腺素外溢,而出现轻微的甲亢症状。在临床中,自身免疫性甲亢为一过性存在,其损伤可能与普通原发性甲状腺功能亢进类似,因此国内外研究较少。在造模过程中常采用免疫介导法,是指 Tg 配合佐剂免疫诱导易感系小鼠,为了提高成模率,常在免疫佐剂基础上配合碘剂诱导来建立 EAT 模型。钟丰鹰等^[33]在大鼠饮用水中添加 0.05% 碘化钠,第 3 周皮下多点注射完全弗氏佐剂,1 周 2 次,第 4-8 周注射统计量不完全弗氏佐剂,1 周 1 次,结果显示模型组 TPOAb、TgAb 浓度升高,FT₃、FT₄ 显著升高,TSH 显著降低。目前,施秉银教授建立了恒河猴甲亢模型,此种模型较小鼠模型能更好地模拟人类甲亢的全部表型。

2.2.4 自发性自身免疫性甲状腺炎

自发性自身免疫性甲状腺炎是指没有外界因素

表 2 实验性桥本甲状腺炎动物模型造模方法比较

类型	造模方法及步骤	动物种类及周龄	造模周期	给药部位及药物用量
自身免疫甲状腺功能正常模型	异源性甲状腺抗原免疫法:弗氏佐剂结合 Tg 皮下注射诱导	6-7 周龄 NOD 小鼠	49 天	尾部底部注射 25 μg PTg ^[22]
		4 周龄 NOD 小鼠	49 天	尾部底部注射 100 μg PTg ^[35]
	单纯碘剂诱导法:NaI 喂养	5 周龄 NOD.H-2h4 小鼠	28-168 天	-1.6 mg·L ⁻¹ 、4 mg·L ⁻¹ 、40 mg·L ⁻¹ 、400 mg·L ⁻¹ NaI ^[25]
		7-8 周龄 NOD.H-2h4 小鼠	42-56 天	-0.05% NaI ^[36-37]
自身免疫性甲减模型	脾细胞体外活化移植免疫法:mTg 联合弗氏佐剂或脂多糖诱导	6-10 周龄 CAB/J 小鼠	30 天	静脉注射第 1-20 天 150 μg mTg+15 μg LPS, 第 27 天 25 μg·mL ⁻¹ mTg 和 5 ng·mL ⁻¹ IL-12 ^[27]
	免疫佐剂配合碘剂诱导法:弗氏佐剂结合 Tg 皮下注射诱导,并配合碘水饲养	SD 大鼠	28 天	足垫部、背部、颈部皮下注射每只 100 μL PTg+500 mg·L ⁻¹ NaI ^[28]
	重组 TSHR 多肽免疫法:重组 TSHR 融合蛋白的细胞外部分与麦芽糖结合蛋白连结形成的活性多肽进行免疫诱导	6-8 周龄 BALB/c 小鼠	60 天	胫前肌注射 4 μg、6 μg、8 μg、10 μg TSHR-c 蛋白混悬液 ^[30]
		6 周龄 BALB/c 小鼠	90 天	腹腔注射 5 μg aa352-366-KLH、5 μg aa352-366-KLH+5 μg TSHR、5 μg KLH ^[38]
	异源性甲状腺抗原免疫法:弗氏佐剂结合 Tg 皮下注射诱导	6-8 周龄 CAJ/CBA 小鼠 Balb/c 小鼠	49 天	尾部底部注射每只 0.2 mg PTg ^[31]
		4-6 周龄 Lewis 大鼠 Wistar 大鼠	63 天	尾部底部注射每只 1 mg PTg ^[31]
自身免疫性甲亢模型	免疫佐剂配合碘剂诱导法:弗氏佐剂结合 Tg 皮下注射诱导,并配合碘水饲养	4 周龄 Lewis 大鼠	56 天	足垫部、背部、颈部皮下注 0.05% NaI+100 μg PTg/0.2 mL ^[33]
		SD 大鼠	56 天	足垫部、背部、颈部皮下注 0.064% NaI+100 μg PTg/0.2 mL ^[39]

的干预下自发出现甲状腺炎的方式。NOD.H-2h4小鼠作为自发性自身免疫性甲状腺炎造模所选的主要动物类型,在NOD遗传背景下表达H-2^k和I-A^k基因,其中H-2^k是HT的易感单倍型基因,发生HT概率很高。并且一部分NOD.H-2h4小鼠可存在自发性甲状腺单核细胞浸润,病变轻微。实验中可选择Beagle犬、OS鸡等,由于饲养条件及相应试剂盒受限,近些年主要以NOD.H-2h4小鼠为主。He等^[34]选用5周龄雌性NOD.H-2h4小鼠喂养0.05% NaI,于0、2、4、8、16周处死,在第4周出现甲状腺淋巴细胞浸润,第16周TgAb水平升高。该种模型操作简单、成功率高,但是NOD.H-2h4小鼠在国内的引种较少,造模周期长,会耗费大量的时间和经费。

3 AITD合并并发症造模

3.1 桥本脑病模型

抗 α -烯醇化酶氨基端抗体是一种高度特异性的HE诊断生物标志物^[40]。其中,抗原 α -烯醇化酶(ENO1)共存于小鼠的甲状腺和脑组织中,并与神经细胞关系密切。秦娟^[41]采用“ENO1重组蛋白+免疫佐剂”法构建桥本脑病模型。造模时选用CBA/J雌性小鼠,皮下多点注射CFA乳化的ENO1重组蛋白(每只100 μ g),2周后注射IFA充分乳化的ENO1重组蛋白和等量无菌去离子水以加强免疫。结果显示,造模组小鼠甲状腺出现不同程度的炎症浸润,TgAb升高;末次免疫14周后,造模小鼠ENO1的自身免疫反应损伤大脑皮质和海马区组织,引起神经元功能障碍,导致学习记忆能力下降,证明HE造模成功。

3.2 AITD合并不孕不育或流产模型

Tg免疫可导致Tg抗体的产生和胎儿吸收率的增加^[42]。妊娠早期,免疫耐受是胎儿生长存活的重要步骤,抗Tg可通过早期免疫作用抑制母体对胎儿抗原的免疫反应和诱导耐受,引起胎儿排斥反应发生流产^[43]。Zhang等^[44]选用4周龄雌性CBA/J小鼠,5周龄时用CFA乳化的mTg(每只75 μ g)进行初次免疫,7周龄时再用IFA乳化的mTg(每只75 μ g)加强免疫,增强免疫4周后,CBA/J雌性小鼠与Balb/c雄性小鼠交配,出现雌性阴道黏膜堵塞被认为是怀孕第0.5天,在小鼠怀孕第13.5天处死。结果显示,与对照组相比,模型组甲状腺发生大量淋巴细胞浸润;TgAb显著升高,胚胎体积明显缩小,胎儿的吸收率增加,提示AITD合并流产小鼠

模型建立成功。

3.3 AITD相关肾病模型

在临床中,AITD相关肾病患者最常见的病理类型为膜性肾病,其造模较为成熟,而系膜增生性肾炎、局灶性肾小球硬化等其他疾病研究较少。膜性肾病是由Th2细胞介导的体液免疫所致,致使IgG4为主的原位免疫复合物形成,激活补体,导致肾脏损伤。牛血清白蛋白(c-BSA)能直接与肾小球结合,诱导离体灌注大鼠肾脏原位免疫复合物形成,此方法目前广泛应用于膜性肾病动物模型的建立^[45]。赵亚云等^[46]选用BALB/c雄性小鼠多点皮下注射CFA乳化的0.2 mg 阳离子C-BSA(2 mg·mL⁻¹),2周后尾部静脉注射C-BSA(6.5 mg·kg⁻¹),每周3次,持续6周后,测定24 h尿蛋白>60 μ g,IgG沿毛细血管壁呈颗粒样沉积,提示膜性肾病造模成功。该方法建立的模型与人类膜性肾病十分相近,均以辅助T细胞2介导免疫应答,两者的基因相似度高达95%,并且具有周期短、成模稳定、饲养容易、成模率高的优点。

4 中医证候体质合并造模方法

中医辨证施治为中医治疗的基础,构建动物的中医证候模型为中医研究疾病的潜在机制及诊疗用药提供了重要的意义。目前中医自身免疫性甲状腺疾病尚无公认的动物模型制备标准。大多以疾病临床表现、病因、病机为切入点,采用“病证结合”的方法进行造模。陈凯先院士强调:通过病证结合创造中西医统一新医学^[47]。本文从病证结合角度出发,根据动物的症状表现及现有的诊断标准来判断模型是否造模成功。以下主要针对2种HT中医证候模型的制备进行阐述。

4.1 肝郁气滞证HT模型

中医认为,肝喜条达而恶抑郁,故“郁怒”为造模肝郁气滞证的主要病因。目前报道中尚未有肝郁气滞证HT动物模型的建立,但根据病证结合思路,可采用“在HT动物模型基础上建立肝郁气滞证”的方法造模。张怡等^[48]采用“束缚法”,将雄性SD大鼠每天置于直径6.5 cm、长22 cm的圆柱透气束缚瓶内6 h,共计35天。结果显示,模型组大鼠由烦躁不安,易激怒转为食欲不振、活动减少等表现,糖水偏好率、旷场试验及血清中IL-17A、IL-6、TGF- β 、IL-10指标明显下降,提示造模成功。孙凯滨等^[49]每天通过2种方式刺激

表3 各证型动物模型评估标准

证型	造模方法	评估标准	参考文献
肝郁气滞证	束缚法	①活动减少,反应迟钝、情绪低落;②胡须下垂,叫声尖细;③进食量减少;④体质量下降;	[48]
	夹尾法+(束缚法、禁食、禁水、暴食、暴饮、冰袋站立)中的一种	⑤腹部肿胀;⑥贴边、扎堆、身体蜷缩;⑦嗜睡、弓背、发色枯黄、掉毛;⑧大便干结、粪便块大	[49]
肝郁脾虚证	高碘水+免疫诱导+慢性束缚应激+过度疲劳+饮食失节法	①活动减少、反应迟钝、情绪低落;②体质量下降;③进食量减少;④大便时软时溏;⑤肛温降低或无变化;⑥游泳耐力降低;⑦倦怠、懒动、眯眼、弓背、蜷缩扎堆	[51]

Wistar 大鼠,一种为每日 0.5 h 夹尾,另外一种从以下方式中随机抽取:束缚 1 h;昼夜颠倒;禁食 24 h;禁水 24 h;暴食;暴饮;冰袋上站立 0.5 h。每天早上 9:00 进行第 1 刺激,另一次随机时间进行刺激,持续进行 28 天,建立肝郁气滞大鼠模型。通过模型组证候积分以及血清淀粉酶、TNF- α 、IL-6 水平升高证明造模成功。利用“束缚法”“夹尾法”等刺激小鼠郁怒进一步造模,具有很好的表现效度,诱导后大鼠的异常行为与中医肝郁气滞相关疾病的表现较为相似。从病因学角度采用病证结合法模拟肝郁气滞的发病可供借鉴。此种造模方法操作简单、应用广泛,但也有其局限性,该方法侧重情志因素刺激,很难判断束缚法、夹尾法等病因造模方法对小鼠的刺激程度,模型的稳定性较差。

4.2 肝郁脾虚证 HT 模型

肝郁脾虚证因情志失调,致使肝郁化火乘脾,脾虚痰湿内聚,出现颈部不适、疲劳乏力、烦躁、腹胀、便秘、舌淡红、苔薄白等症状。肝郁脾虚证 HT 模型常采用“高碘水+免疫诱导+慢性束缚应激+过度疲劳+饮食失节法”的方法进行造模。王琳等^[50]选用 0.64 g·L⁻¹ 高碘水+0.2 mL 免疫弗氏佐剂并联合 4 周过度疲劳和饮食失节法造模。实验第 5 周起,将模型组大鼠每天 8:00 放入束缚桶内 3 h,13:00 将大鼠放入盛有温水的塑料大桶中游泳至疲劳(疲劳标准:全身下沉至没颈,不能继续坚持游泳),并且隔日禁食,隔日给足量食物,时长为 4 周。通过观察甲状腺组织形态以及甲状腺功能指标证明造模成功。刘佳^[51]采用相同的方法造模,但选用 0.5 g·L⁻¹ 高碘水进行喂养,结果显示在造模第 8 周时,TPOAb 和 TgAb 超过正常组 2 倍,甲状腺组织出现淋巴浸润,提示造模成功。两者对比显示,碘水的

浓度与 TPOAb 和 TgAb 抗体滴度呈负相关。综上,此种造模方法是在中医辨证施治理论和中医病因病机学说基础上,通过动物模型来模拟临床发病,可见大鼠从易激怒转变为情绪抑郁、活动度减少、乏力便溏等症状,与中医肝郁脾虚相关疾病的表现较为相似,因此常用来构建肝郁脾虚证的动物模型。但上述造模方法也有一定局限性,该种造模方法的操作繁杂,干扰因素较多,模型稳定性较差,食物喂养的种类及频率难以统一,缺乏一定的规范性。

5 讨论和展望

AITD 是一种复杂的自身免疫性疾病,随着动物模型建立的不断完善,为发病机制和临床诊疗提供了巨大的贡献。从现代医学角度来说,小鼠种类、造模的方法和周期、注射的药剂浓度和频次等不同对 AITD 造模结果均有影响,通过比较造模效果、成模率及实验目的来寻求最佳的造模方式,方便广大科研人员在 该领域深入研究。从传统医学角度来说,本篇文章在造模过程中主要采用了“病证结合法”,利用中医病因学说来造型,现代医学理论来造病,既继承中医思路又遵循现代医学的认识。但由于该种方式造模仍处于探索和挖掘的阶段,仍存在一些不足,值得去思考与解决:①临床中,疾病与证候发展是相互影响的,但目前造模中,病与证相对独立,与临床实际出入;②中医证候诊断标准尚存在主观化,未得到系统的统一,量化评价造模成功,仍是难题;③通过人为刺激或药物干预建立证型模型,是否对原发疾病模型产生其他影响。综上所述,希望在不久的将来,可以构建既符合中医证候又遵循临床实际的动物模型平台,为中医药防治 AITD 的研究奠定基础。

参考文献

1 Antonelli A, Ferrari S M, Corrado A, et al. Autoimmune thyroid disorders. *Autoimmun Rev*, 2015, 14(2):174-180.

2956 [Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology]

- 2 Li Y, Teng D, Ba J, *et al.* Efficacy and safety of long-term universal salt iodization on thyroid disorders: epidemiological evidence from 31 provinces of mainland China. *Thyroid*, 2020, 30(4):568–579.
- 3 Bogusławska J, Godlewska M, Gajda E, *et al.* Cellular and molecular basis of thyroid autoimmunity. *Eur Thyroid J*, 2022, 11(1):e210024.
- 4 Vargas-Uricoechea H. Molecular mechanisms in autoimmune thyroid disease. *Cells*, 2023, 12(6):918.
- 5 Vargas-Uricoechea H, Mera-Mamian A, Bastidas-Sanchez B, *et al.* Population status of iodine and its potential effects on thyroid function and autoimmunity in southwestern Colombia. *J Clin Med Res*, 2022, 14(3):126–135.
- 6 Vargas-Uricoechea H, Bastidas B, Pinzón M V. Population status of selenium in Colombia and associated factors: a cross-sectional study. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 2022, 44(2):153–158.
- 7 Khozam S A, Sumaili A M, Alflan M A, *et al.* Association between vitamin D deficiency and autoimmune thyroid disorder: a systematic review. *Cureus*, 2022, 14(6):e25869.
- 8 Liang C, Yang H, Huang X, *et al.* Thyrotropin receptor autoantibody (TRAb) enhance the expression of thyrotropin receptor on mouse brain vascular endothelial cells: *in vivo* and *in vitro*. *Cell Mol Biol*, 2023, 69(9):67–74.
- 9 Naicker M, Naidoo S. Cellular and molecular distribution of thyroid-specific proteins, thyroid-stimulating hormone receptor (TSH-R) and thyroglobulin (TG) in the central nervous system. *Neurochem Int*, 2022, 155:105305.
- 10 Hayashi M, Hayashi K, Miyoshi M, *et al.* Hashimoto encephalopathy and thyroid storm by diabetic ketoacidosis and acute pancreatitis: a case report. *Cureus*, 2024, 16(2):e53659.
- 11 Kim D K, Choi H, Lee W, *et al.* Brain hypothyroidism silences the immune response of microglia in Alzheimer's disease animal model. *Sci Adv*, 2024, 10(11):eadi1863.
- 12 Thangaratinam S, Tan A, Knox E, *et al.* Association between thyroid autoantibodies and miscarriage and preterm birth: meta-analysis of evidence. *BMJ*, 2011, 342:d2616.
- 13 Ru X, Yang M, Teng Y, *et al.* Association of maternal thyroid peroxidase antibody during pregnancy with placental morphology and inflammatory and oxidative stress responses. *Front Endocrinol*, 2023, 14:1182049.
- 14 Moniwa N, Shioya Y, Gocho Y, *et al.* A case of membranous nephropathy secondary to asymptomatic Graves' disease. *CEN Case Rep*, 2022, 11(3):309–313.
- 15 Zhao L, Liu Y, Su H, *et al.* Relationship between autoimmune thyroid disease and nephropathy: a clinicopathological study. *Medicine*, 2021, 100(23):e26273.
- 16 段素静, 湛剑飞, 谭薇, 等. 自身免疫性甲状腺疾病肾上腺皮质功能变化与肾虚证的相关性研究. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(19):2227–2229.
- 17 Kojima A, Tanaka-Kojima Y, Sakakura T, *et al.* Spontaneous development of autoimmune thyroiditis in neonatally thymectomized mice. *Lab Invest*, 1976, 34(6):550–557.
- 18 Wick G, Boyd R, Hala K, *et al.* Pathogenesis of spontaneous autoimmune thyroiditis in Obese strain (OS) chickens. *Clin Exp Immunol*, 1982, 47(1):1–18.
- 19 Stott D I, Hassman R, Neilson L, *et al.* Analysis of the spectrotypes of autoantibodies against thyroglobulin i
- 20 Beduleva L, Sidorov A, Fomina K, *et al.* Experimental rat models for Hashimoto's thyroiditis. *J Endocrinol Investig*, 2024, 47(5):1205–1214.
- 21 Kanistras I, Hatzioannou A, Lymberi P. A novel pathogenic peptide of thyroglobulin (2208–2227) induces autoreactive T-cell and B-cell responses in both high and low responder mouse strains. *Immunology*, 2014, 142(2):300–306.
- 22 Wang N, Sun Y, Yang H, *et al.* Hashimoto's thyroiditis induces hippocampus-dependent cognitive alterations by impairing astrocytes in euthyroid mice. *Thyroid*, 2021, 31(3):482–493.
- 23 Burek C L, Talor M V. Environmental triggers of autoimmune thyroiditis. *J Autoimmun*, 2009, 33(3/4):183–189.
- 24 Sharma R, Traore K, Trush M A, *et al.* Intracellular adhesion molecule-1 up-regulation on thyrocytes by iodine of non-obese diabetic.H2(h4) mice is reactive oxygen species-dependent. *Clin Exp Immunol*, 2008, 152(1):13–20.
- 25 Teng X, Shan Z, Teng W, *et al.* Experimental study on the effects of chronic iodine excess on thyroid function, structure, and autoimmunity in autoimmune-prone NOD.H-2h4 mice. *Clin Exp Med*, 2009, 9(1):51–59.
- 26 Uhliarova B, Hajtman A. Hashimoto's thyroiditis – an independent risk factor for papillary carcinoma. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2018, 84(6):729–735.
- 27 Fang Y, Chen K, Jackson D A, *et al.* Eosinophils infiltrate thyroids, but have no apparent role in induction or resolution of experimental autoimmune thyroiditis in interferon- $\gamma^{-/-}$ mice. *Immunology*, 2010, 129(3):329–337.
- 28 刘雅楠. 隔药饼灸对实验性自身免疫性甲状腺炎大鼠 *microRNA* 表达谱的影响及免疫调节机制研究. 上海: 上海中医药大学博士学位论文, 2019.
- 29 Cui S L, Yu J, Shoujun L. Iodine intake increases IP-10 expression in the serum and thyroids of rats with experimental autoimmune thyroiditis. *Int J Endocrinol*, 2014, 2014:581069.
- 30 岳瑞宏. *TSHR* 羧基端原核表达蛋白片段对 *BALB/c* 小鼠 *T_s*、*TRAb* 的影响. 兰州: 兰州大学硕士学位论文, 2014.
- 31 赵树君. 碘/硒对 *AITD* 易感性和 *TPO* 抗体生成影响的研究. 天津: 天津医科大学博士学位论文, 2007.
- 32 Godlewska M, Banga P J. Thyroid peroxidase as a dual active site enzyme: focus on biosynthesis, hormonogenesis and thyroid disorders of autoimmunity and cancer. *Biochimie*, 2019, 160:34–45.
- 33 钟丰鹰, 张程斐, 秦慧钊, 等. 穿山龙颗粒制剂对自身免疫性甲状腺炎大鼠 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的影响. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(16):42–49.
- 34 He X, Xiong C, Liu A, *et al.* Phagocytosis deficiency of macrophages in NOD.H-2^{h4} mice accelerates the severity of iodine-induced autoimmune thyroiditis. *Biol Trace Elem Res*, 2018, 184(1):196–205.
- 35 Wu Z, Cai Y, Xia Q, *et al.* Hashimoto's thyroiditis impairs embryo implantation by compromising endometrial morphology and receptivity markers in euthyroid mice. *Reprod Biol Endocrinol*, 2019, 17(1):94.
- 36 Braley-Mullen H, Yu S. NOD. H-2h4 mice: an important and

- underutilized animal model of autoimmune thyroiditis and Sjogren's syndrome. *Adv Immunol*, 2015, 126:1-43.
- 37 Braley-Mullen H, Sharp G C, Medling B, *et al.* Spontaneous autoimmune thyroiditis in NOD.H-2h4 mice. *J Autoimmun*, 1999, 12(3):157-165.
- 38 朱云娟, 陈宁, 黄丽娟, 等. TSHR大分子及其活性多肽在BALB/c小鼠体内的免疫原特性研究. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(4):634-637.
- 39 尹谢添. 基于荟萃分析和网络药理学探讨夏枯草通过 JNK/P38MAPK 信号通路调节细胞凋亡治疗自身免疫性甲状腺炎机制研究. 武汉: 湖北中医药大学博士学位论文, 2022.
- 40 Yoneda M. Hashimoto's encephalopathy and autoantibodies. *Brain Nerve*, 2018, 70(4):305-314.
- 41 秦娟. α -烯醇化酶特异自身免疫反应对甲状腺和脑影响的实验研究. 沈阳: 中国医科大学博士学位论文, 2017.
- 42 Matalon S T, Blank M, Levy Y, *et al.* The pathogenic role of anti-thyroglobulin antibody on pregnancy: evidence from an active immunization model in mice. *Hum Reprod*, 2003, 18(5):1094-1099.
- 43 Zhao Y, Zheng Q, Jin L. The role of B7 family molecules in maternal-fetal immunity. *Front Immunol*, 2020, 11:458.
- 44 Zhang X, Lv X, Chen M, *et al.* Analysis of blimp-1 and PD-1/PD-L1 immune checkpoint in an autoimmune thyroiditis animal model. *Int J Endocrinol*, 2020, 2020:6543593.
- 45 Jao T M, Wu C Z, Cheng C W, *et al.* Urokinase plasminogen activator deficiency aggravates cationic bovine serum albumin-induced membranous nephropathy through T helper cell type 2-prone immune response in mice. *Lab Invest*, 2023, 103(7):100146.
- 46 赵亚云, 方敬, 刘海平, 等. 基于 NOX4/ROS/p38 信号通路探讨三焦祛湿方对膜性肾病小鼠的抗氧化应激作用. *中草药*, 2022, 53(4): 1076-1083.
- 47 国海东, 罗朝淑. 中国科学院院士陈凯先: 病证结合推动中西医实现“1+1>2”. *科技日报*, 2023-04-10(2).
- 48 张怡, 张铭珈, 冯庭宇, 等. 肝郁气滞、肝郁脾虚证慢性应激模型大鼠外周血 Th17/Treg 平衡偏移的比较. *中国中医基础医学杂志*, 2023, 29(2):229-233.
- 49 孙凯滨, 孙蓉. 肝郁气滞型急性胰腺炎病证结合大鼠模型建立的研究. *中国中药杂志*, 2020, 45(23):5732-5737.
- 50 王琳, 张兰, 许可, 等. 基于 SOCS13JAK-STATs 信号通路探讨软坚消癭颗粒治疗肝郁脾虚型桥本甲状腺炎模型大鼠的实验研究. *中华中医药学刊*, 2023, 41(4):251-254, 301.
- 51 刘佳. 实验性自身免疫性甲状腺炎肝郁脾虚证大鼠模型研究. 沈阳: 辽宁中医药大学硕士学位论文, 2020.

Model Study and Comparison of Models for Autoimmune Thyroid Disease and its Complications

ZHANG Shuang¹, YANG Yufeng¹, ZANG Ningzi², SHI Yan¹, LI Pin^{1,2}

(1. Graduate School of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China;

2. Liaoning university hospital of traditional Chinese medicine, Shenyang 110847, China)

Abstract: Autoimmune thyroid disease (AITD) is a common organ-specific autoimmune disease. The pathological features are significantly increased titers of Thyroglobulin antibody (TgAb) and/or Thyroid peroxidase antibody (TPOAb), accompanied by lymphocyte infiltration in thyroid tissue. The incidence of this disease is increasing year by year, its pathogenesis is complex, and its complications such as Hashimoto's encephalopathy, infertility or abortion, and related nephropathy are harmful. Therefore, this disease has become one of the research hotspots in this field. Animal models play a crucial role in basic disease research. In recent years, many scholars have revealed the etiology, pathogenesis, complications, and therapeutic intervention mechanisms of traditional Chinese and Western medicine through different animal models of AITD. In this paper, animal selection, specific modeling methods and model evaluation of mouse models of AITD and its complications in recent years were summarized and analyzed, so as to provide a reference for the selection of animal models for AITD basic experimental research.

Keywords: Autoimmune thyroid disease, Complications of autoimmune thyroid disease, Animal models, Modeling method

(责任编辑: 李青)