

高祥举,高冬梅,陈宪梅,等. 超声影像在评价大鼠结节性甲状腺肿的应用[J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 78-84, 118.

Gao XJ, Gao DM, Chen XM, et al. Ultrasound imaging for evaluation of nodular goiter in rats [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 78-84, 118.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.010

超声影像在评价大鼠结节性甲状腺肿的应用

高祥举^{1,2,3},高冬梅^{1,2},陈宪梅^{1,2,3},宋婷婷^{2,3,4},高 占^{1,2,3},高 杰^{1,2*},王杰琼^{2,3,4*}

(1.山东中医药大学中医学院,济南 250355;2.山东中医药大学情志病证研究创新团队,济南 250355;
3.山东中医药大学情志病证肝藏象药理青年科研创新团队,济南 250355;4.山东中医药大学药学院,济南 250355)

【摘要】 目的 利用超声技术,确定大鼠甲状腺定位,同时分析评价大鼠结节性甲状腺肿模型的病变、造模程度,为结节性甲状腺肿及相关甲状腺疾病大鼠模型的诊断评估提供技术方法。**方法** 40只6~8周龄SPF级Wistar大鼠,雌雄各半,其中20只作为对照组,其余大鼠灌服丙基硫氧嘧啶(PTU)溶液8周,构建结节性甲状腺肿大鼠模型,造模结束后对大鼠进行甲状腺超声检测,同时进行病理检测,与超声结果进行对比。**结果** 超声检测显示,模型组大鼠甲状腺前后、内外侧径均显著大于对照组($P<0.001$),同时可见模型组大鼠腺体不对称性增大,甲状腺侧叶有结节无包膜,边界较为模糊,不规整,散在有点状或条状纤维增生的强回声。模型组大鼠甲状腺切片HE染色显示,甲状腺组织形状、滤泡大小均不规则,差异较大,且上皮细胞增生明显,排列紊乱,胶质压缩且分布不均。模型组大鼠的超声和病理学检测均符合疾病诊断。**结论** 超声检测技术可以较好地进行活体评价大鼠结节性甲状腺肿动物模型,是值得推广的结节性甲状腺肿大鼠模型的评价方法。

【关键词】 甲状腺疾病;动物模型;模型评价;超声探查

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2023)01-0078-07

Ultrasound imaging for evaluation of nodular goiter in rats

GAO Xiangju^{1,2,3}, GAO Dongmei^{1,2}, CHEN Xianmei^{1,2,3}, SONG Tingting^{2,3,4}, GAO Zhan^{1,2,3},
GAO Jie^{1,2*}, WANG Jieqiong^{2,3,4*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China.
2. Innovation Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355. 3. Emotional Disease Syndrome Innovative Chinese Medicine Research Young Scientific Research and Innovation Team in Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355. 4. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355)

【Abstract】 Objective To determine localization of the rat thyroid gland by ultrasound technology, analyze and evaluate lesions and the degree of modeling in the rat nodular goiter model, and provide a technical method for diagnostic evaluation of the rat model of nodular goiter and related thyroid diseases. **Methods** Forty 6~8 weeks old SPF-grade Wistar rats (male and female) were used as the control group and 20 rats were instilled with a propylthiouracil (PTU) solution for 8 weeks to establish a rat model of nodular goiter. Ultrasound examination of the thyroid gland was performed after modeling, along with pathological examination for comparison with ultrasound. **Results** Ultrasonography showed that

[基金项目] 济南市“高校20条”资助项目(2020GXR002)。

[作者简介] 高祥举(1997—),男,在读硕士研究生,研究方向:肝藏象病机与调肝方药作用机制。E-mail: gaoxiangju2020@163.com

[通信作者] 高杰(1974—)女,教授,博士,研究方向:肝藏象病机与调肝方药作用机制。E-mail: jiegaosdutcm@163.com

王杰琼(1982—)女,副教授,博士,研究方向:中药药理学及情志病调肝方药药理研究。E-mail: jieqiong2016@126.com

* 共同通信作者

the anterior-posterior and medial-lateral diameters of the thyroid gland in the model group were significantly larger than those in the control group ($P < 0.001$). Conversely, asymmetric enlargement of the gland was observed in the model group. The shape and size of thyroid tissue and the follicle size were irregular in HE-stained thyroid glands of the model group. In the group, epithelial cells were obviously hyperplastic, disorganized and unevenly distributed with compressed colloid. Ultrasound and pathological tests were consistent with the disease diagnosis. **Conclusions** Ultrasound is a good method for *in vivo* evaluation of a rat nodular goiter model.

【Keywords】 thyroid disease; animal models; model evaluation; ultrasound probing

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

甲状腺肿是一种常见的内分泌疾病,存在单纯性甲状腺肿,也可伴有结节性甲状腺肿、桥本甲状腺炎、Graves 病等甲状腺疾病^[1-2]。2015 年~2017 年对国内 31 个省、直辖市、自治区的流行病学调查结果显示,成年人甲状腺肿大的患病率为 1.17%^[3],且与少年代谢综合征、糖尿病、肝炎等有关,其本身病变率达 5%^[4]。结节性甲状腺肿(nodular goiter)是甲状腺肿中的一类,多由甲状腺激素分泌不足,刺激甲状腺体积增大,随时间发展,甲状腺在增大过程中形成一个或多个结节^[5]。

虽然近些年来,对甲状腺相关疾病基础研究日益增多,但其发病机制及病理过程尚不完全清楚,因此建立可重复、简单易行且稳定的动物模型显得尤为重要,国内多以制作大鼠模型为主。目前临床上公认的结节性甲状腺肿的诊断金标准是超声影像及细针穿刺病理结果^[6-7],但缺乏动物模型超声检测操作步骤、方法及相关参数。目前也未见应用超声检测大鼠结节性甲状腺肿细节报道,这对于基础研究人员使用超声检测大鼠甲状腺来说有不小的困难。本实验通过建立大鼠结节性甲状腺肿模型,确定其超声下甲状腺位置,再利用超声技术来进行模型评价,造模后取甲状腺组织进行病理学模型鉴定,旨在建立一种简单易行、稳定可靠的大鼠甲状腺结节模型评价方法。同时为今后大鼠甲状腺超声检测的操作提供技术参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠 40 只,体重 150~180 g,6~8 周,雌雄各半,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0011],饲养于山东中医药大学实验动物中心大楼[SYXK(鲁)2017-0022]。饲养大鼠运抵实验室后先行适应性饲养 1 周,自由饮水进食。保持 12 h/12 h 明暗周期,实验室温度控制(23 ± 1)℃,湿度控制 50%~60%,噪声 ≤ 60 dB,

实验动物使用经山东中医药大学实验动物福利伦理审查委员会批准(SDUTCM2022030001),并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

生理盐水(辰欣药业股份有限公司);丙基硫氧嘧啶(PTU,上海朝晖药业有限公司,国药准字 H31021082);异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公司);薇婷丝滑沁香脱毛膏(利洁时家化中国有限公司);耦合剂(天津津亚科技发展有限公司);40%多聚甲醛;HE 染色试剂盒(上海源叶生物科技有限公司)。粘附载玻片(中国世泰);游标卡尺(上海美耐特实业有限公司);Ultra 超优刀片(赛默飞);P60-VET 动物超声(大为宠物医疗(江苏)有限公司);高频曲棍球探头 10.0 MHz(大为宠物医疗(江苏)有限公司);R580 呼吸麻醉机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

取 Wistar 大鼠雌雄各 20 只,随机分 2 组,每组 20 只,即对照组(control)、模型组(model),雌雄分笼饲养。

1.3.2 PTU 法制备结节性甲状腺肿大鼠模型

采用 Tamura 的方法造模^[8],模型组用生理盐水配成 0.1%的 PTU 溶液,每只大鼠每天按 100 mg/kg 连续灌服 8 周。对照组给与同体积的生理盐水连续灌服 8 周。

1.3.3 超声检测分组大鼠结节性甲状腺肿方法

(1)大鼠甲状腺超声定位及检测

选用大为 P60 型彩色多普勒超声仪,高频曲棍球探头。将老鼠颈部脱毛,充分暴露检查部位,采用异氟烷进行呼吸麻醉,探头从下颌骨开始,沿颈部长轴向下进行连续横切扫查,同时大鼠身体一侧放置病理标尺记录位置,上线与大鼠下颌骨下缘对齐,探头探查至舌骨时记录距离,并继续向下探查,

待图像中甲状腺整体消失再记录位置。同时记录甲状腺的状况,包括甲状腺两叶和颈部相邻结构的横向和纵向图像。对左右侧叶分别测量内外侧、前后和头尾直径(图 1A、图 1B),并根据超声影像结果进行诊断分析。

(2) HE 染色法检测大鼠甲状腺病理形态学改变

大鼠仰卧解剖位,麻醉后从颈部正中中线剪开大鼠颈部的皮肤,由胸骨剪至下颌,暴露甲状软骨和气管,用眼科剪小心剪开软骨腹面的肌肉和筋膜组织,将甲状软骨完全暴露(图 2A),从软骨下插入眼科弯镊,将软骨和气管撑开完全暴露甲状腺(图 2B),放置一病理尺与老鼠身体平行,使用另一病理尺进行测量在体甲状腺的上下缘距下颌骨的距离(图 2C、图 2D),并记录数值。用手术剪从喉剪开,为减少误差,向下计数至第六气管软骨剪掉(图 2E、图 2F),取下后使用游标卡尺测量甲状腺侧叶的内外侧、前后和头尾直径。之后浸入 40%多聚甲醛固定 48 h,包埋,从甲状腺向气管方向连续切片,每张切片厚度 3 μm ,进行常规 HE 染色。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad prism 9.0.0 进行分析处理,大鼠甲状腺超声测量与体外游标卡尺测量采用配对 t 检验,对照组与模型组的甲状腺侧叶前后、内外、头尾径长比较采用独立样本 t 检验, $P<0.05$ 表示差异具有显著意义。

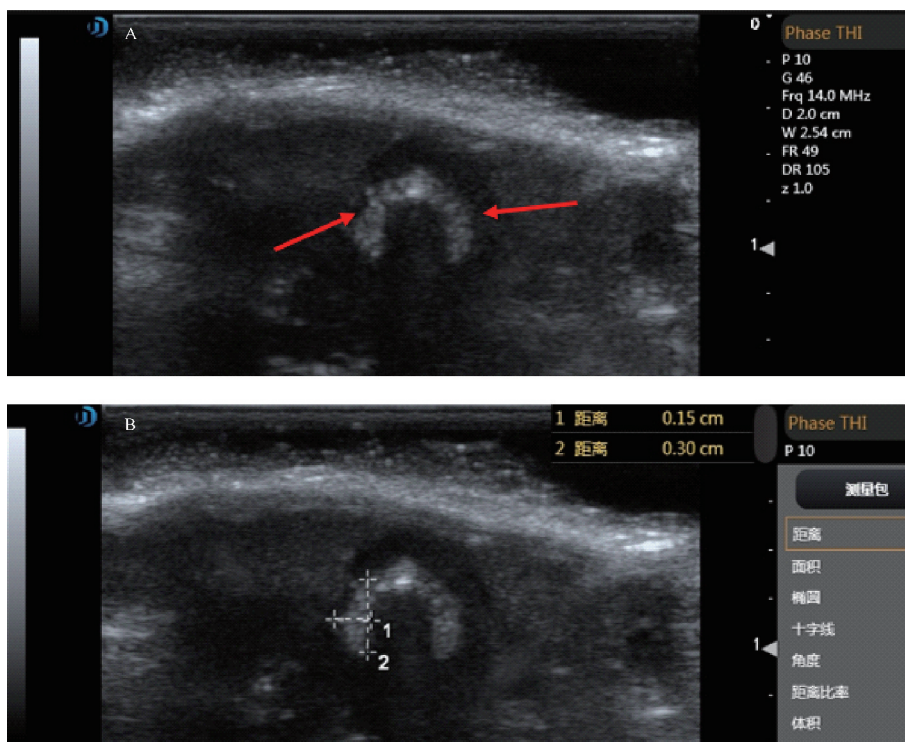
2 结果

2.1 大鼠甲状腺的超声定位

通过记录超声颈部横切扫描甲状腺位置参数,结果显示:对照组中,甲状腺位于大鼠下颌骨下 $(2.4\pm0.4)\sim(3.3\pm0.5)\text{cm}$ 的位置(图 3A),模型组中,甲状腺位于大鼠下颌骨下 $(2.1\pm0.3)\sim(3.3\pm0.3)\text{cm}$ 的位置(图 3B)。由此可见,在使用超声对大鼠甲状腺进行扫描时,位于距离大鼠下颌骨 $(2.3\pm0.5)\sim(3.3\pm0.5)\text{cm}$ 处可探查甲状腺(图 3C、图 3D)。

2.2 大鼠甲状腺的超声测量结果及体外验证

取大鼠处死前最后一次超声扫描数据与处死后体外甲状腺游标卡尺测量结果进行分析,分

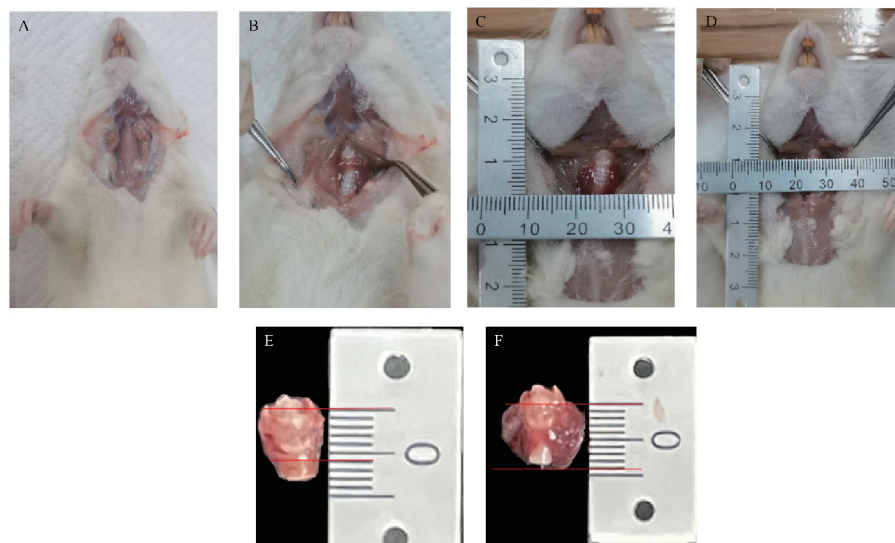


注:A:大鼠颈部超声下甲状腺均匀的腺体组织,红色箭头为甲状腺位置;B:超声下甲状腺的单侧叶的测量。

图 1 超声下大鼠甲状腺图像及侧叶测量

Note. A, Homogeneous glandular tissue of the thyroid gland under ultrasound in the rat neck, red arrows show the location of the thyroid gland. B, Measurement of the unilateral lobe of the thyroid gland under ultrasound.

Figure 1 Ultrasound images of the rat thyroid gland and lateral lobe measurements

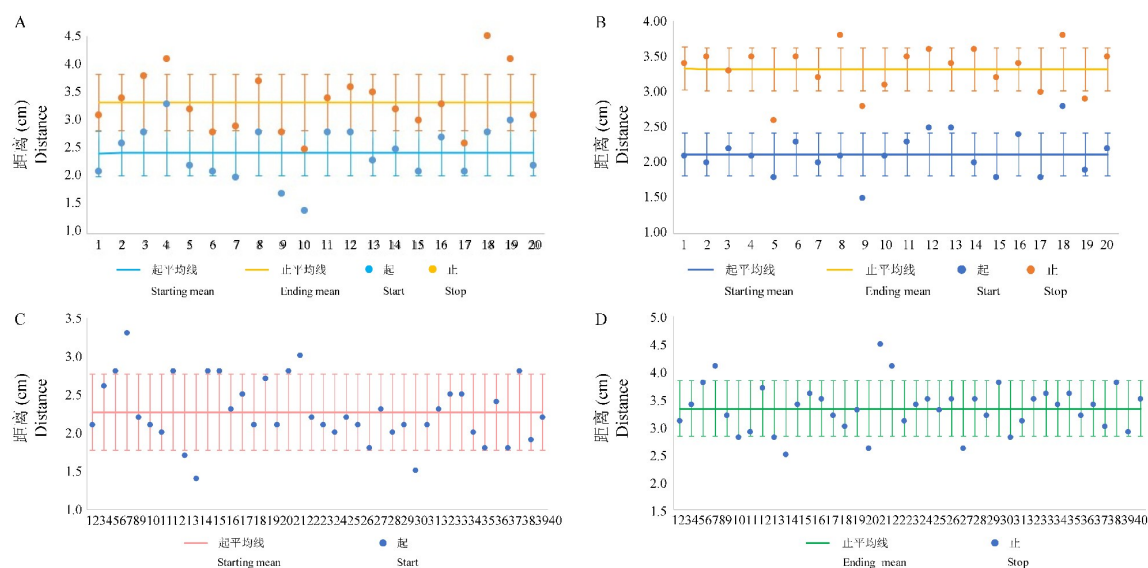


注:A:大鼠解剖暴露甲状软骨;B:完全暴露甲状腺;C:测量大鼠甲状腺上缘到下颌骨距离;D:测量大鼠甲状腺下缘到下颌骨距离;E:离体对照组甲状腺;F:离体模型组甲状腺。

图2 大鼠甲状腺在体测量及离体图像

Note. A, Rats dissected to expose the thyroid cartilage. B, Fully exposed thyroid gland. C, Measurement of the distance from the upper edge of the thyroid gland to the mandible in rats. D, Measurement of the distance from the lower edge of the thyroid gland to the mandible in rats. E, Isolated control group thyroid gland. F, Isolated model group thyroid gland.

Figure 2 *In vivo* measurements and *ex vivo* images of the rat thyroid gland



注:A:蓝色线表示起始平均数 2.4,上下误差 0.4,黄色线代表终止平均数 3.3,上下误差 0.5;B:蓝色线表示起始平均数 2.1,上下误差 0.3,黄色线代表终止平均数 3.3,上下误差 0.3;C:全部大鼠甲状腺起始位置,红色线代表平均数 2.2,上下误差 0.5;D:全部大鼠甲状腺终止位置绿色线代表平均数 3.3,上下误差 0.5;记录数据时采用的单位为 cm。

图3 多普勒超声检测大鼠甲状腺的起、止位置

Note. A, Blue line indicates the starting mean 2.4 with an up and down error of 0.4, and the yellow line represents the ending mean 3.3 with an up and down error of 0.5. B, Blue line indicates the starting mean 2.1 with an up and down error of 0.3, and the yellow line represents the ending mean 3.3 with an up and down error of 0.3. C, Starting position of the thyroid gland in all rats, the red line represents the mean 2.2, with an upper and lower error of 0.5. D, Ending position of thyroid gland in all rats, the green line represents the mean 3.3, with an upper and lower error of 0.5. Data are recorded in cm.

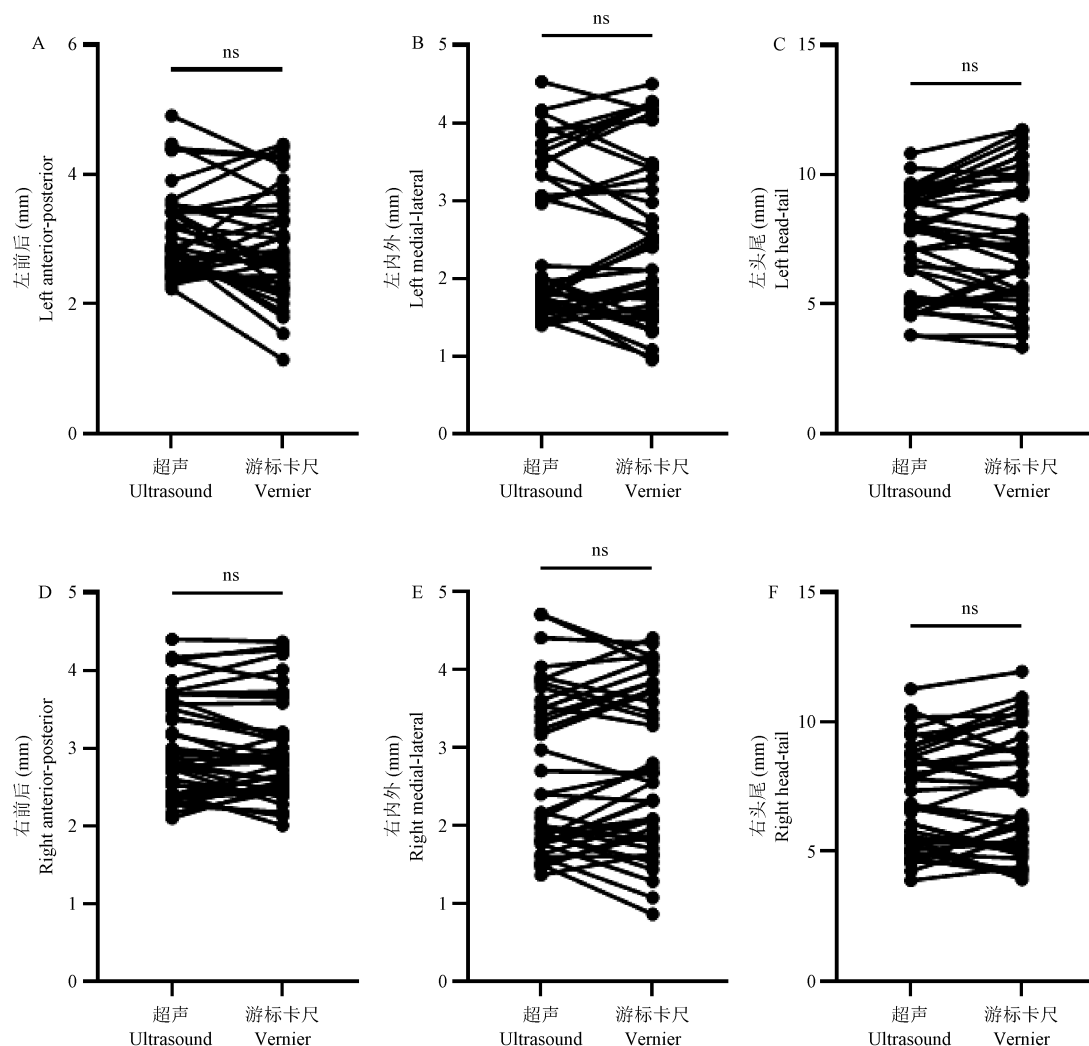
Figure 3 Ultrasound detection of the starting and ending position of the thyroid gland in rats

别对甲状腺的左叶、右叶的内外侧、前后和头尾直径进行配对 t 检验, 活体超声扫描测量与甲状腺体外测量结果没有显著性差异 ($P>0.05$)。结果如图 4。

2.3 甲状腺超声检查结果分析

甲状腺由左、右两叶和峡部组成。超声颈前正中横切面甲状腺呈马蹄型或者蝶形, 颈侧区纵切面呈上窄下宽的三角形, 甲状腺被膜显示为光滑整齐的高回声带。对照组大鼠甲状腺实质回声呈均匀

偏高回声, 内部可见血管呈管状无回声 (图 5A)。超声检测模型组大鼠甲状腺, 出现两侧腺体不对称性增大, 其内存在异常组织, 而且甲状腺侧叶有结节无包膜, 边界较为模糊, 不规整, 散在有点状或条状纤维增生的强回声 (图 5B)。运用 t 检验对对照组与模型甲状腺的前后、内外、头尾直径进行对比, 得到模型组的前后、内外直径与对照组存在显著性差异 ($P<0.0001$), 头尾直径没有显著性差异 ($P>0.05$)。结果如图 5C~5H。

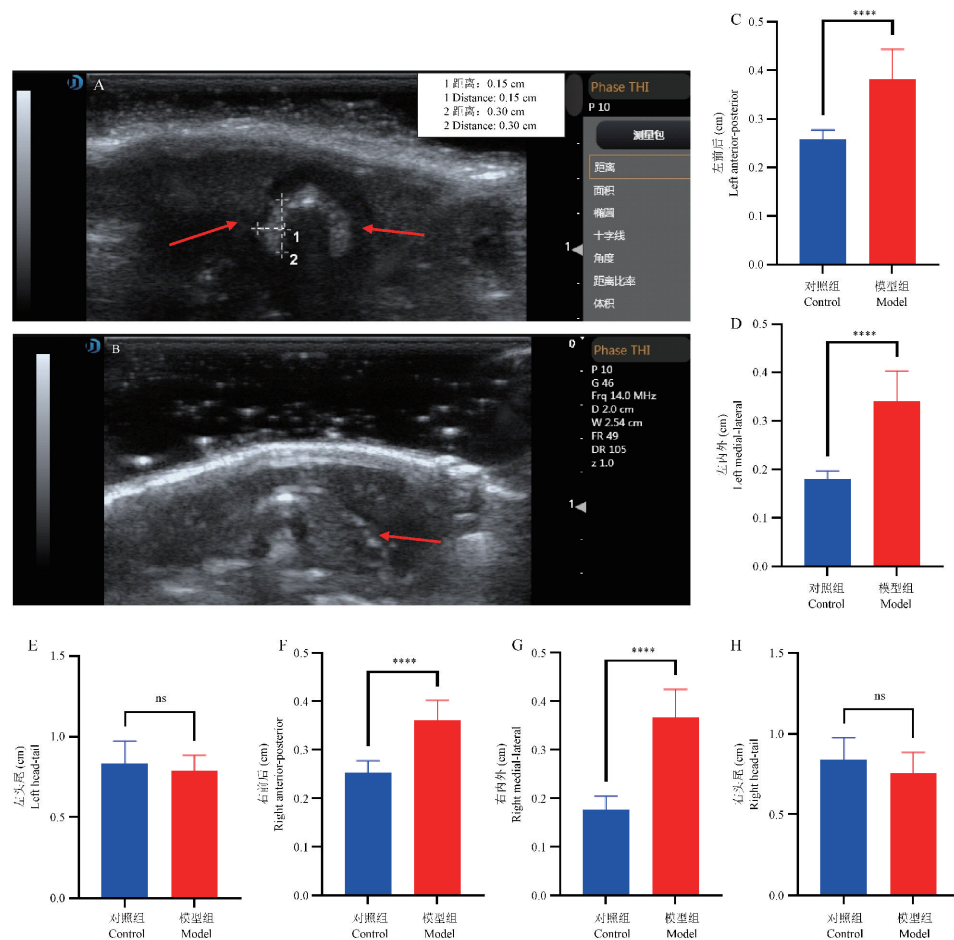


注: A~C, 分别为超声下与体外游标卡尺测量大鼠甲状腺左侧叶前后、内外、头尾直径的对比分析; D~F, 分别为超声下与体外游标卡尺测量大鼠甲状腺右侧叶前后、内外、头尾直径的对比分析; Ultrasound 为超声扫描时得到的甲状腺数值, Vernier 为体外游标卡尺测量数值, 测量单位为 mm。

图 4 两侧甲状腺超声扫描与游标卡尺测量各数值配对 t 检验结果

Note. A~C, Comparison analysis of the anterior-posterior, medial-lateral, and head-tail diameters of the left lobe of the rat thyroid gland measured under ultrasound and with *in vitro* vernier calipers, respectively. D~F, Comparison analysis of the anterior-posterior, medial-lateral, and head-tail diameters of the right lobe of the rat thyroid gland measured under ultrasound and with *in vitro* vernier calipers, respectively. Ultrasound is the value of the thyroid gland obtained during ultrasound scanning, Vernier is the *in vitro* vernier calipers measurement, and the unit of measurement in mm.

Figure 4 Paired t -test results for each value of ultrasound scan and vernier caliper measurement of the thyroid gland on both sides

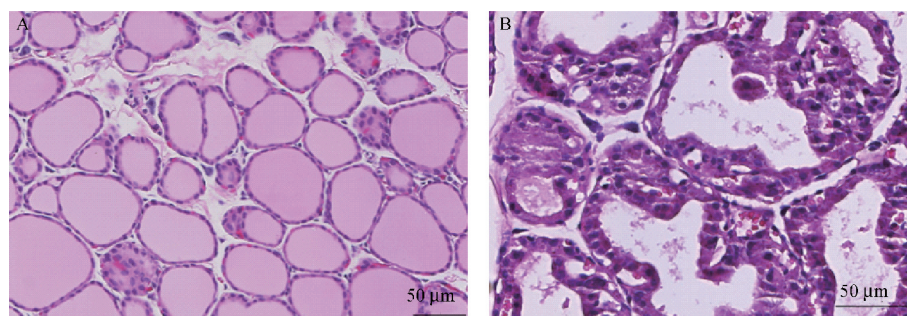


注:A:对照组大鼠甲状腺超声影像;B:模型组大鼠甲状腺超声影像;C~E:分别为对照组与模型组甲状腺左侧叶前后、内外、头尾直径的对比分析, **** $P<0.0001$;F~H:分别为对照组与模型组甲状腺右侧叶前后、内外、头尾直径的对比分析, **** $P<0.0001$ 。在对照组和模型组超声图片中红色箭头表明了甲状腺的位置,分析统计时数据单位为 cm。

图 5 多普勒超声影像检测各组大鼠甲状腺形态学特点分析

Note. A, Ultrasound images of the thyroid gland of rats in the control group. B, Ultrasound images of the thyroid gland of rats in the model group. C~E, Comparative analysis of the diameters of the left lobe of the thyroid gland from anterior-posterior, medial-lateral, and head-tail in control and model groups, respectively, **** $P<0.0001$. F~H, Comparative analysis of the diameters of the right lobe of the thyroid gland from anterior-posterior, medial-lateral, and head-tail in control and model groups, respectively, **** $P<0.0001$. Red arrows in the ultrasound images of control group and model group indicate the location of the thyroid gland, The unit of data for analysis and statistics is cm.

Figure 5 Analysis of thyroid examination results analysis of morphological characteristics of thyroid gland in various groups of rats by ultrasonic imaging



注:A:对照组大鼠甲状腺 HE 染色;B:模型组大鼠甲状腺 HE 染色。

图 6 HE 染色检测各组大鼠甲状腺病理学特点分析

Note. A, Thyroid HE staining of rats in control group. B, Thyroid HE staining of rats in model group.

Figure 6 HE staining was used to detect the pathological characteristics of thyroid in various groups

2.4 甲状腺病理学检测结果分析

对甲状腺切片进行 HE 染色后,在×400 显微镜下观察到对照组大鼠甲状腺组织滤泡大小均匀,滤泡腔内胶质均匀,上皮细胞排列规整,可见少量毛细血管(图 6A);与对照组相比,模型组大鼠甲状腺滤泡大小不规则,且上皮细胞增生明显,排列紊乱,胶质压缩分布不均(图 6B)。模型组大鼠甲状腺组织改变符合结节性甲状腺肿病理检查诊断^[9],与超声诊断一致。

3 讨论

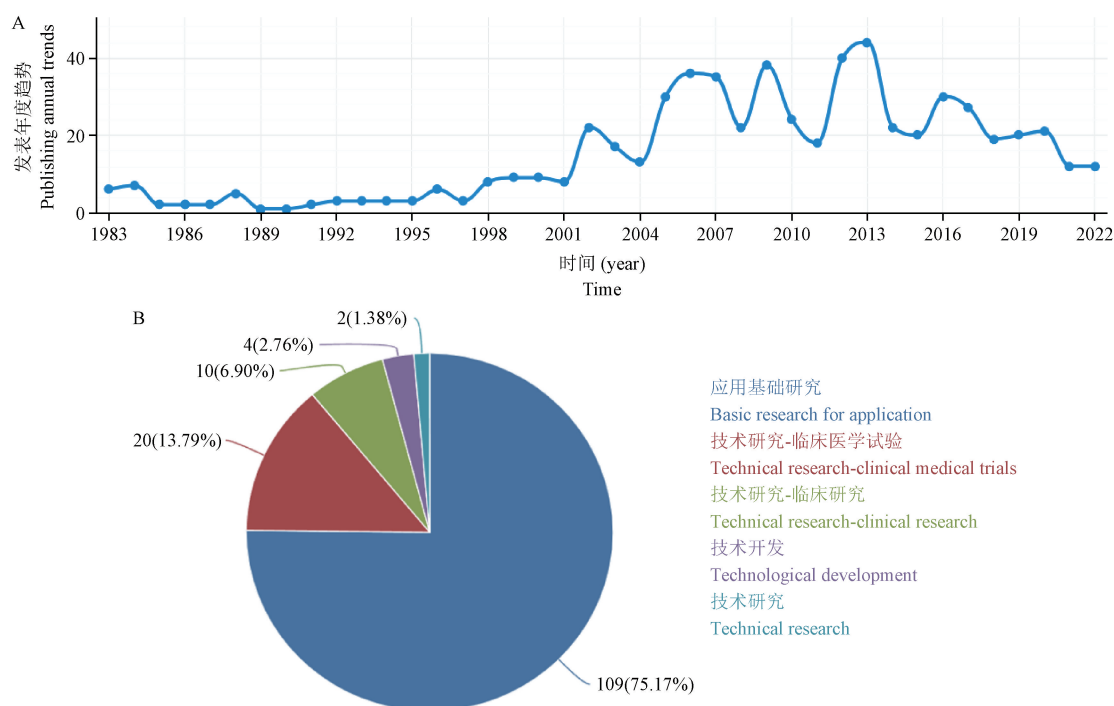
近些年来,甲状腺基础研究较早些年投入巨大,且不断开发出新的甲状腺动物模型^[10],发表的相关文章数量不断增加(图 7A、图 7B)。目前国内结节性甲状腺肿动物模型多以大鼠为主,制作方法多样,其原理都是通过不同方式诱使大鼠摄入碘降低,导致甲状腺肿,Sun 等^[11]通过药物诱导雌性 SD 大鼠含 PTU 的饮用水 6 周;Alayoubi 等^[12]通过喂食低碘鼠粮;Li 等^[13]喂养雄性 Wistar 大鼠甲减组含 MMI 的饮用水 12 周等来制作甲状腺肿动物模型。

结节性甲状腺肿动物模型目前缺乏经济、高效

的评价方法。实验室评价大鼠模型使用超声诊断的极少,多以处死大鼠后,取甲状腺进行 HE 染色,因其不可逆转性使这种方法存在明显不足。而超声诊断结节性甲状腺肿的灵敏度、特异性和安全性较高,该方法具有方便、经济、快速、无创等优势,且是临床人群诊断的金标准。

本实验探讨超声影像技术在大鼠结节性甲状腺肿评价方面的应用。通过 PTU 连续灌胃 8 周,建立动物模型,再结合超声和体外检测对甲状腺的大小、病理情况进行对照,结果一致。证明了超声准确诊断大鼠结节性甲状腺肿。同时通过此实验明确了超声下大鼠甲状腺定位参数,为后续研究者的工作提供科学依据和技术参考。

本实验利用超声技术来评价结节性甲状腺肿大鼠动物模型的建立,并利用病理学方法验证了其检测结果的准确性和可靠性,从而证实了超声技术能够较好的反映出结节性甲状腺肿的形态,避免了在造模过程中对活体动物采样所造成的损伤以及处死动物进行病理学检测等缺点,影响模型的进一步研究。该技术的应用为今后甲状腺疾病动物模型的评价建立提供了一种更方便的鉴定方法,同时



注:A:甲状腺动物模型文献发表年度趋势;B:基础研究在甲状腺动物模型中文献的占比。

图7 发表文章年度趋势及类型

Note. A, Annual trend of publications related to thyroid animal models. B, Proportion of basic research areas in the literature on thyroid animal models.

Figure 7 Annual trends and types of published articles

(下转第 118 页)