

林晓瑛,张萌,周星辰,等. 两种表达人促甲状腺激素受体的质粒电穿孔诱导 Graves 病小鼠模型比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(1): 14-22.

LIN X Y, ZHANG M, ZHOU X C, et al. Comparative study of two plasmid vectors expressing the human thyroid stimulating hormone receptor used to induce a mouse model of Graves' disease via electroporation [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(1): 14-22.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.01.002

两种表达人促甲状腺激素受体的质粒电穿孔诱导 Graves 病小鼠模型比较研究

林晓瑛,张萌,周星辰,吴梦芝,许华阳,王玲,伍丽萍*,施秉银*

(西安交通大学第一附属医院内分泌代谢科,西安 710061)

【摘要】 目的 本研究旨在通过比较在两种表达人促甲状腺激素受体(thyrotropin receptor, TSHR) A 亚单位基因的质粒载体在电穿孔介导下诱导 Graves 病动物模型的效果,为探索 Graves 病防治方法提供更为有效的研究工具。方法 构建表达 TSHR A 亚单位的两种质粒 pcDNA3.1-TSHR A 和 pTriEx1.1-TSHR A,通过对 BALB/c 小鼠肌内注射并立即电穿孔的方式诱导 Graves 病,每3周1次,共4次。对照组小鼠使用 PBS。在第2次电穿孔后1周采血测定血清 TSHR 抗体(thyrotropin receptor antibodies, TRAb)。末次电穿孔后3周对小鼠进行心脏超声检查。末次电穿孔后4周处死小鼠,收集血液、甲状腺及眼眶组织,测定血清总甲状腺素(total thyroxine, TT4)并进行组织病理学检查。结果 pcDNA3.1-TSHR A 组($n = 15$)和 pTriEx1.1-TSHR A 组($n = 13$)小鼠血清 TRAb 平均值分别为(6.9 ± 2.0) U/L 和(7.5 ± 2.2) U/L。后者显著高于对照组(4.9 ± 0.5) U/L ($P = 0.033$)。pcDNA3.1-TSHR A 组和 pTriEx1.1-TSHR A 组小鼠血清 TT4 平均值分别为(41.4 ± 23.8) ng/mL 和(63.2 ± 53.7) ng/mL,均高于对照组(20.2 ± 4.0) ng/mL ($P < 0.01$)。甲状腺病理显示模型组小鼠甲状腺滤泡上皮增生并且有 T 细胞浸润。心脏超声显示 pTriEx1.1-TSHR A 组的左心室质量高于对照组($P = 0.007$)和 pcDNA3.1-TSHR A 组($P = 0.012$)。眼眶病理显示模型组小鼠的眼外肌中存在纤维化改变。结论 表达 TSHR A 亚单位的 pcDNA3.1 和 pTriEx1.1 均能通过电穿孔法成功诱导 Graves 病小鼠模型,且诱导甲状腺功能亢进和甲亢眼病的效能相近。pTriEx1.1-TSHR A 诱导甲状腺毒症性心脏病的效能优于 pcDNA3.1-TSHR A。

【关键词】 Graves 病;质粒;电穿孔;小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 01-0014-09

Comparative study of two plasmid vectors expressing the human thyroid stimulating hormone receptor used to induce a mouse model of Graves' disease via electroporation

LIN Xiaoying, ZHANG Meng, ZHOU Xingchen, WU Mengzhi, XU Huayang, WANG Ling, WU Liping*, SHI Bingyin*

(Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Corresponding author: WU Liping. E-mail: plwzw999@163.com; SHI Bingyin. E-mail: shibingy@126.com

【基金项目】 国家自然科学基金(82170805,81670725,81873638,81970679)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (82170805,81670725,81873638,81970679)。

【作者简介】 林晓瑛,女,在读博士研究生,研究方向:甲状腺自身免疫疾病。Email: lxy1024@stu.xjtu.edu.cn

【通信作者】 施秉银,男,教授,主任医师,硕士,研究方向:甲状腺自身免疫疾病,内分泌代谢性疾病。Email: shibingy@126.com;

伍丽萍,女,副研究员,主治医师,博士,研究方向:甲状腺自身免疫疾病。Email: plwzw999@163.com。

* 共同通信作者

【Abstract】 Objective The purpose of this study was to provide a more effective method for researching the prevention and treatment of Graves' disease by comparing the effects of two plasmid vectors expressing the human thyrotropin receptor (TSHR) A subunit gene in inducing an animal model of Graves' disease via electroporation. **Methods** Plasmids pcDNA3.1-TSHR A, and pTriEx1.1-TSHR A expressing the TSHR A subunit were constructed and used to induce Graves' disease by intramuscular injection with immediate electroporation once every 3 weeks for a total of 4 times. Mice in the control group were injected with PBS. One week after the second electroporation, blood was collected to measure serum thyrotropin receptor antibody (TRAb). Three weeks following the last electroporation, echocardiography was performed on the mice. Mice were sacrificed 4 weeks after the last electroporation; blood, thyroid, and orbital tissues were collected; serum total thyroxine (TT4) was measured; and histological examination was performed. **Results** The average concentrations of serum TRAb in the pcDNA3.1-TSHR A group ($n = 15$) and the pTriEx1.1-TSHR A group ($n = 13$) were (6.9 ± 2.0) U/L and (7.5 ± 2.2) U/L, respectively. The latter was significantly higher than that in the control group (4.9 ± 0.5) U/L ($P = 0.033$). The average concentrations of serum TT4 in the pcDNA3.1-TSHR A group and pTriEx1.1-TSHR A group were (41.4 ± 23.8) ng/mL and (63.2 ± 53.7) ng/mL, respectively, both higher than that in the control group: (20.2 ± 4.0) ng/mL ($P < 0.01$). Thyroid pathology showed thyroid follicular epithelial hyperplasia with T-cell infiltration in the model group. Echocardiography showed that the left ventricle mass in the pTriEx1.1-TSHR A group was higher than those in the control group ($P = 0.007$) and pcDNA3.1-TSHR A group ($P = 0.012$). Orbital pathology showed fibrotic changes in the extraocular muscles of mice in the model groups. **Conclusions** Both pcDNA3.1 and pTriEx1.1 expressing the TSHR A subunit were able to induce Graves' disease in mice by electroporation, and the efficiency of the two plasmids in inducing hyperthyroidism and Graves' ophthalmopathy was similar. The efficiency of pTriEx1.1-TSHR A in inducing thyrotoxic heart disease was better than that of pcDNA3.1-TSHR A.

【Keywords】 Graves' disease; plasmid; electroporation; mice

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

Graves 病是一种累及甲状腺和全身多器官的自身免疫病,是导致甲状腺功能亢进最常见的原因^[1]。甲状腺功能亢进会导致新陈代谢和能量消耗增加的一系列症状^[2-3]。此外,Graves 病还可能伴有甲状腺毒症性心脏病和眼病的症状^[4-5]。Graves 病现有的治疗方法包括抗甲状腺药物、碘 131 治疗和手术治疗,各有优劣^[6-9]。因此,Graves 病仍然有待进一步研究。

小鼠模型是研究 Graves 病的重要工具。和人类不同,小鼠不会自发发生 Graves 病,不同的研究人员采用了许多不同的方法诱导小鼠出现 Graves 病表型。过去最常用的方法是用腺病毒作为促甲状腺激素受体(thyrotropin receptor, TSHR) A 亚单位的表达载体,肌肉注射诱导小鼠 Graves 病,重复 3 次可以诱导小鼠 Graves 病甲亢表型^[10],随着重复次数的增加可以诱导小鼠 Graves 病眼病表型^[11]。但腺病毒的包装过程复杂且包装后的效能并不稳定,为了优化造模方法,有研究者开始尝试使用质粒作为载体诱导 Graves 病小鼠模型,质粒的制备与腺病毒相比更加简单且

稳定。但是直接注射质粒难以高效地诱导 Graves 病小鼠模型^[12]。所以有研究者在注射质粒的同时,对小鼠进行电穿孔,通过电场的作用,将质粒转染进入小鼠细胞内,这种方法提高了质粒的转染效能,并成功诱导了 Graves 病小鼠模型。

最早在电穿孔辅助下使用质粒作为 TSHR A 亚单位的载体成功诱导 Graves 病动物模型的是日本 KANEDA 等^[13]在 80% ~ 90% 的小鼠中诱导出了甲亢。随后,PAUL BANGA 的研究团队采用了新的质粒 pTriEx-1.1 Neo 进行造模^[14],稳定地诱导小鼠出现 Graves 病甲亢和甲亢并发症眼病表型^[15-22]。同时,pcDNA3.1 质粒也被报道可以作为载体,诱导小鼠出现 Graves 病甲亢和眼病表型^[23-26]。然而,pcDNA3.1 是一种能够在哺乳动物细胞中高效表达的质粒,pTriEx1.1 是一种能够在多种表达系统中高效表征靶基因的质粒,两者的造模情况并未进行比较。因此,本研究旨在比较这两种质粒载体的诱导效果,为之后使用表达 TSHR A 亚单位的质粒电穿孔方法诱导 Graves 病模型时质粒载体的选择提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 38 只雌性 BALB/c 小鼠, 6 周龄, 体重 17 ~ 20 g, 购于西安交通大学实验动物中心【SCXK(陕)2023-002】。小鼠饲养在西安交通大学实验动物中心【SYXK(陕)2023-004】, 温度 20 ~ 22 °C, 湿度 24% ~ 28%, 每日 12 h 光照/12 h 黑暗, 能够自由获得食物和水。本研究方案经西安交通大学医学部动物实验伦理审查批准(2018-159)。

1.1.2 主要试剂与仪器

pcDNA3.1 (汉恒生物, 上海, 中国); pTriEx1.1 (淼灵生物, 武汉, 中国); DH5 α 化学感受态细胞(擎科生物, 北京, 中国); 兔抗 CD3 多克隆抗体, 兔抗 CD4 多克隆抗体, HRP 标记的山羊抗兔免疫组化多聚二抗(赛维尔生物, 武汉, 中国); EndoFree Plasmid Mega Kits(凯杰, 德国); 人血清促甲状腺素受体自身抗体放射受体分析试剂盒(协和医药, 天津, 中国); 碘【125I】-甲状腺

素放射免疫分析药盒(协和医药, 天津, 中国)。

Nanodrop 分光光度计(赛默飞, 美国); ECM 830 系统(哈佛仪器 BTX, 美国); 7 mm 镊子电极(哈佛仪器 BTX, 美国); Vevo 1100 小动物超声成像系统(VisualSonics, 加拿大)。

1.2 方法

1.2.1 表达 TSHR289 质粒 DNA 的准备和克隆

使用了两种质粒表达载体, 分别是: (1) pcDNA3.1, 一种高效的哺乳动物表达载体; (2) pTriEx1.1, 一种多系统表达质粒。扩增人 TSHR A 亚单位(氨基酸残基 22 ~ 289)用于克隆。使用表 1 中的引物分别将 TSHR A 亚单位 cDNA 区克隆到 pcDNA3.1 的 EcoR I 和 Cla I 限制性位点之间和 pTriEx1.1 的 BamH I 和 Not I 限制性位点之间, 构建重组质粒 pcDNA3.1-TSHR A 和 pTriEx1.1-TSHR A, 并且对两个重组质粒均进行全测序。

质粒转化到 DH5 α 化学感受态细胞中进行扩增, 并使用 EndoFree Plasmid Mega Kits 纯化。将纯化的质粒重悬于无菌双蒸水中, 使用 Nanodrop 分光光度计测量浓度, 并在 4 °C 下储存。

表 1 用于构建重组质粒的引物序列

Table 1 Sequence of primers used in the construction of recombinant plasmids

重组质粒 Recombinant plasmids	引物序列(5'-3') Sequence of primers(5'-3')
pcDNA3.1-TSHR A	F: TAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGTTGAATTCCTCCCGAGTCCCCTGAAAAAT R: ATCGCAGATCCTTACTAGTATCGATTCTAGATATCAGTATGGTGGTGGT
pTriEx1.1-TSHR A	F: TGGCGATATCCCGGGAGCTCCTGGATCCATGAGCGGATTTCCGGAGGAT R: GCACGTGTATACAGCTGTGCGGCCGCTTACTGATTCTTAAAAGCACAG

1.2.2 活体肌内注射质粒 DNA 和电穿孔免疫诱导 Graves 病

小鼠随机分为 3 组, 对照组 10 只以及两个模型组 pcDNA3.1-TSHR A 组和 pTriEx1.1-TSHR A 组分别 15 只和 13 只。小鼠麻醉后剃去双侧后腿股二头肌(大腿)的毛发, 用胰岛素注射器双腿分别注射 50 μ L 含 1 mg 质粒的 PBS, 对照组注射不含质粒的 PBS。并立即在注射部位用 ECM 830 系统和 7 mm 镊子电极以 200 V/cm 的电场强度进行电穿孔, 共施加 10 个方波脉冲, 每次持续时间为 20 ms, 频率 1 Hz, 导致明显的肌肉抽搐。电穿孔结束观察动物从麻醉中恢复过来, 并监测是否有痛苦的迹象。小鼠每隔 3 周进行 1 次肌内注

射并电穿孔, 共进行 4 次。在第 2 次电穿孔后 1 周采血, 将血清样本存储在 -80 °C, 直至测定血清 TSHR 抗体 (thyrotropin receptor antibodies, TRAb)。末次电穿孔后 3 周对小鼠进行心脏超声检查。在最后 1 次干预后 4 周处死小鼠, 并收集血液、甲状腺及眼眶组织(图 1), 将血清样品储存在 -80 °C, 直至测定血清总甲状腺素 (total thyroxine, TT4)。

1.2.3 小鼠心脏超声

末次电穿孔后 3 周, 小鼠在异氟烷麻醉下用 Vevo 1100 小动物超声成像系统进行心脏超声检查。检查指标包括舒张末期室间隔厚度, 收缩末期室间隔厚度, 左心室舒张末期内径, 左心室舒

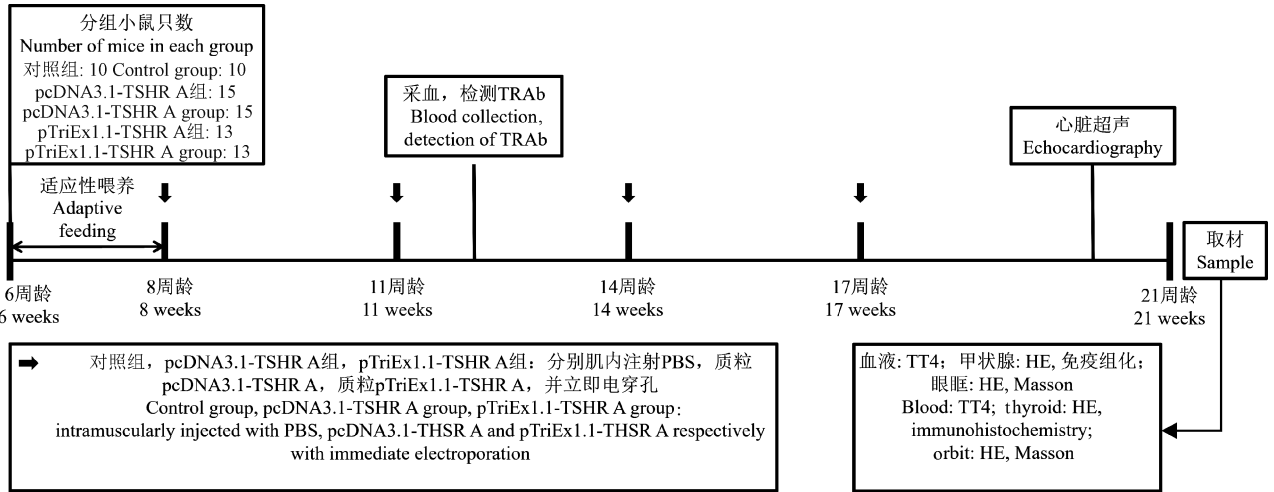


图 1 实验流程

Figure 1 Experiment process

张末期内径,舒张末期左心室后壁厚度,收缩末期左心室后壁厚度,射血分数,短轴缩短率,左心室质量,左心室舒张末期容积,左心室收缩末期容积和心率。

1.2.4 血清 TRAb 和 TT4 的测量

分别使用人血清促甲状腺素受体自身抗体放射受体分析试剂盒和碘¹²⁵I-甲状腺素放射免疫分析药盒测量血清 TRAb 和血清 TT4。

1.2.5 甲状腺和眼眶组织的组织学检查

收集甲状腺组织固定在 4% 甲醛中。甲状腺组织包埋在石蜡中,并切片进行苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色以及 CD3 和 CD4 免疫组化染色。眼眶组织包埋在石蜡中,脱蜡后将切片进行 HE 染色和 Masson 染色。

1.3 统计学分析

统计分析采用 IBM SPSS Statistics 26.0 进行。实验结果以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。评估所有连续变量的正态性,对正态分布的数据使用单因素方差分析比较组间差异,对非正态分布的数据使用 Kruskal-Wallis 检验比较组间差异。对二分类变量使用 fisher 精确检验比较组间差异。 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定

为了确定重组质粒是否构建成功,对两个重组质粒进行测序,并将测序结果在 Genbank 中和已发表的人 TSHR A 亚单位的 mRNA 序列 NM_

000369.5 比对,比对结果显示序列一致(图 2)。

2.2 小鼠甲状腺功能水平

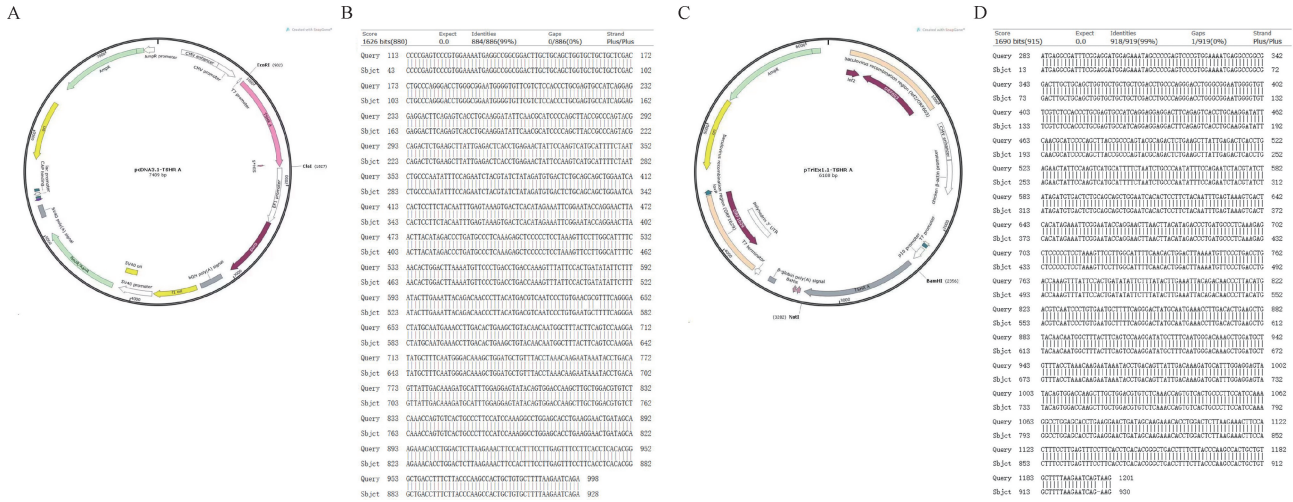
2.2.1 血清 TRAb 水平

对照组小鼠血清 TRAb 为 (4.9 ± 0.5) U/L, pTriEx1.1-TSHR A 组小鼠血清 TRAb 为 (7.5 ± 2.2) U/L, 显著高于对照组 ($P = 0.033$), pcDNA3.1-TSHR A 组小鼠血清 TRAb 为 (6.9 ± 2.0) U/L, 与对照组和 pTriEx1.1-TSHR A 组均无显著性差异(图 3A)。

以对照组小鼠血清 TRAb 的 $(\bar{x} + 2s)$ 为正常上限,即 6.0 U/L, 超出正常上限为 TRAb 阳性, pcDNA3.1-TSHR A 组小鼠血清 TRAb 的阳性率为 71.4% ($P = 0.015$), pTriEx1.1-TSHR A 组小鼠血清 TRAb 的阳性率为 66.7% ($P = 0.015$), 差异均具有显著性,两模型组间无显著性差异(图 3B)。

2.2.2 血清 TT4 水平

造模结束后测得对照组小鼠血清 TT4 平均值为 (20.2 ± 4.0) ng/mL, pcDNA3.1-TSHR A 组小鼠血清 TT4 平均值为 (41.4 ± 23.8) ng/mL ($P = 0.001$), pTriEx1.1-TSHR A 组小鼠血清 TT4 平均值为 (63.2 ± 53.7) ng/mL ($P < 0.001$), 差异均具有显著性。两个模型组之间没有显著性差异 ($P = 0.152$) (图 3C)。以对照组小鼠血清 TT4 的 $(\bar{x} + 2s)$, 即 28.2 ng/mL 为正常上限, 超出正常上限为 TT4 阳性, pcDNA3.1-TSHR A 组小鼠血清 TT4 的阳性率为 73.3% ($P < 0.001$), pTriEx1.1-TSHR A 组小鼠血清 TT4 的阳性率为 91.7% ($P <$

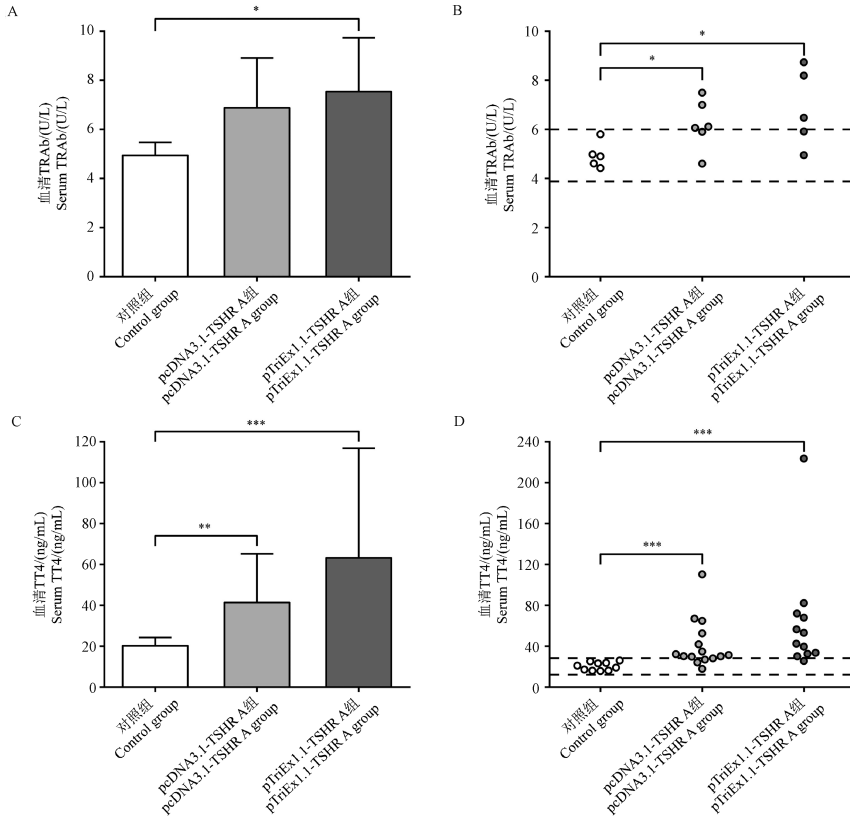


注:A:pcDNA3.1-TSHR A 的质粒图谱;B:pcDNA3.1-TSHR A 测序结果与人 TSHR A 亚单位的 mRNA 序列之间的比对;C:pTriEx1.1-TSHR A 的质粒图谱;D:pTriEx1.1-TSHR A 测序结果与人 TSHR A 亚单位的 mRNA 序列之间的比对。

图 2 表达 TSHR A 的重组质粒的构建和鉴定

Note. A. Plasmid profile of pcDNA3.1-TSHR A. B. Alignment between sequencing results of pcDNA3.1-TSHR A and the mRNA sequence of human TSHR A subunit. C. Plasmid profile of pTriEx1.1-TSHR A. D. Alignment between sequencing results of pTriEx1.1-TSHR A and the mRNA sequence of human TSHR A subunit.

Figure 2 Construction and identification of recombinant plasmids expressing TSHR A



注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。(下图同)

图 3 甲状腺功能的对比

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

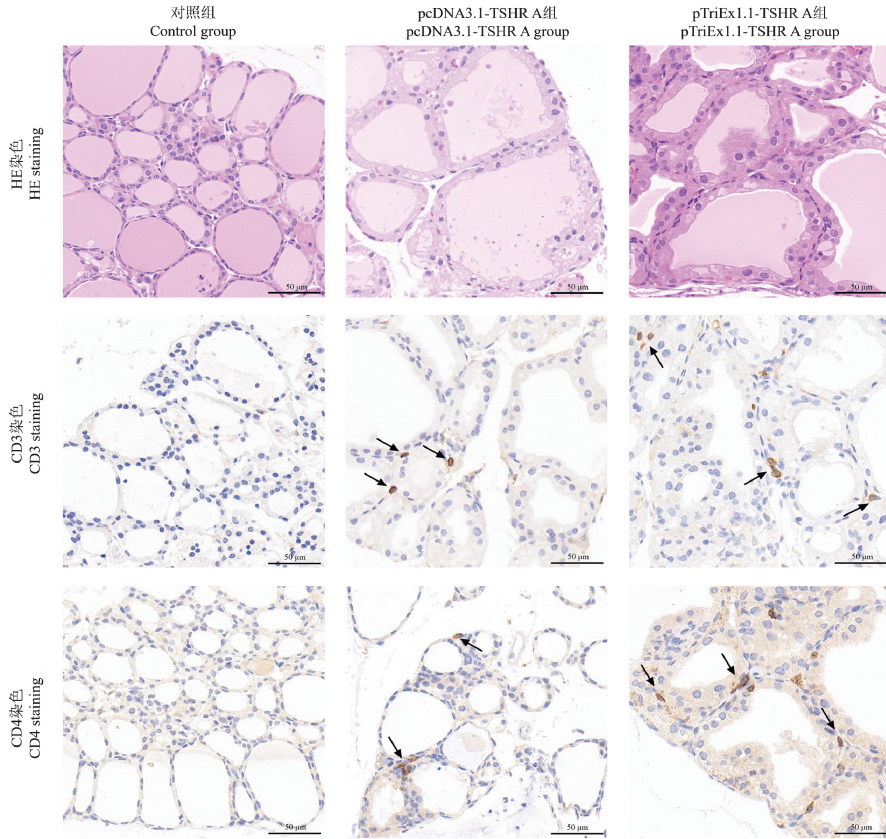
Figure 3 Comparison of thyroid function

0.001), 差异均具有显著性, 两模型组间无显著性差异(图 3D)。

2.3 小鼠甲状腺病理改变

小鼠甲状腺标本 HE 染色和免疫组化染色结果在光镜下 40 倍观察可见(图 4): 对照组小鼠甲状腺滤泡上皮细胞呈扁平状, 模型组小鼠甲状腺

滤泡上皮细胞显著增生呈立方状或高柱状, 部分滤泡细胞形成乳头状折叠向滤泡腔内突起, 滤泡间隙可见 T 淋巴细胞浸润。其中 pcDNA3.1-TSHR A 组小鼠甲状腺增生比例为 45.5% (5/11), pTriEx1.1-TSHR A 组小鼠甲状腺增生比例为 60% (3/5)。



注: 箭头: 免疫组化染色阳性细胞。

图 4 甲状腺的病理改变

Note. Arrow. Cells positive for immunohistochemical staining.

Figure 4 Pathologic change of thyroid

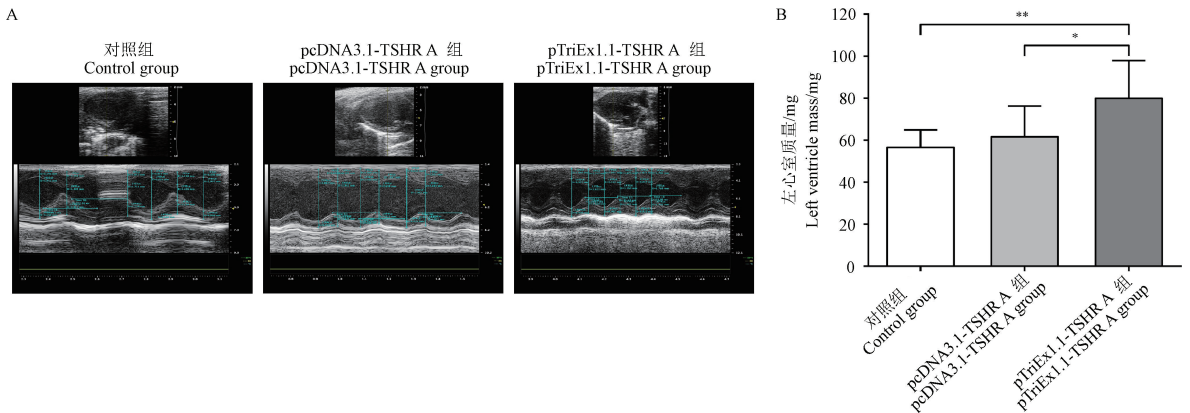


图 5 心脏超声的对比

Figure 5 Comparison of echocardiography

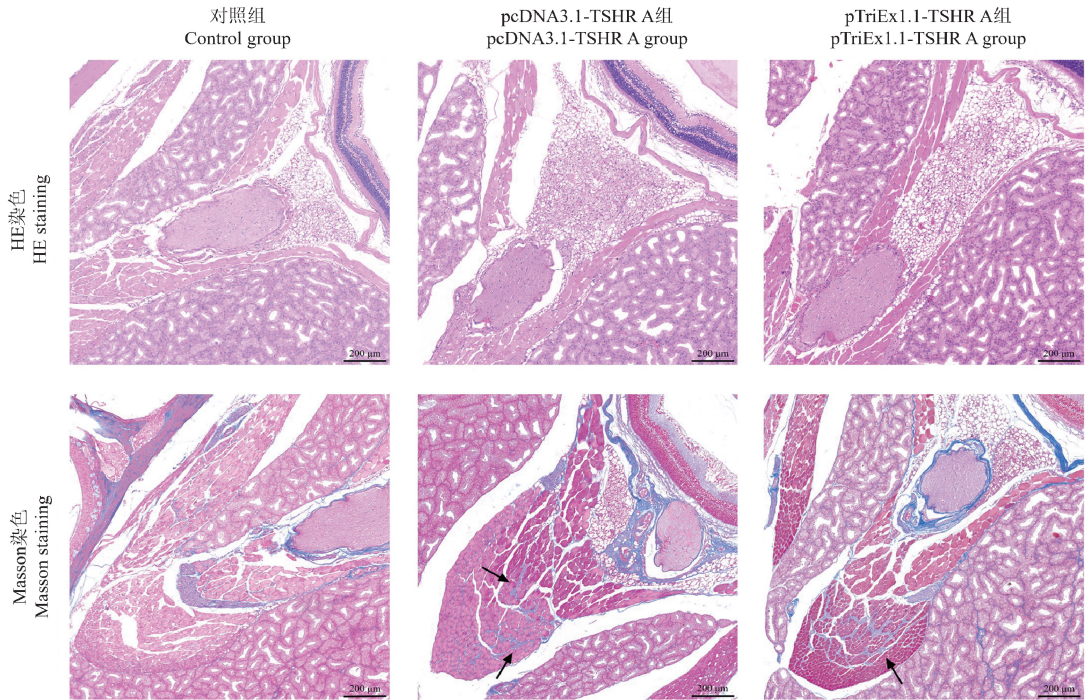
2.4 模型组小鼠心脏超声的改变

pTriEx1.1-TSHR A 组小鼠左心室质量平均值为 (79.9 ± 17.9) mg, 高于对照组 (56.5 ± 8.4) mg ($P = 0.007$) 和 pcDNA3.1-TSHR A 组 (61.6 ± 14.7) ($P = 0.012$) (图 5)。提示 pTriEx1.1-TSHR A 组小鼠存在左心室心肌肥厚。其余指标

各组间无明显差异。

2.5 模型组小鼠眼眶组织学改变

小鼠眼眶标本 HE 和 Masson 染色结果在光镜下 10 倍观察见(图 6); HE 染色可见模型组小鼠球后脂肪增多, Masson 染色在模型组小鼠的眼外肌中观察到纤维化改变, 肌肉间隙胶原纤维增多。



注: 箭头: 眼外肌中的纤维化改变。

图 6 眼眶的病理改变

Note. Arrow. Fibrosis in extraocular muscles.

Figure 6 Pathologic change of orbit

3 讨论

小鼠模型是 Graves 病的重要研究手段。通过在鼠体内表达 TSHR A 亚单位使小鼠产生 TRAb 是诱导小鼠发生 Graves 病的有效方法。本研究在电穿孔介导下通过两种表达人 TSHR A 亚单位基因的质粒载体成功诱导 Graves 病甲亢表型和眼病表型, 同时还比较了两种质粒的效果, 并且首次在该模型中发现甲状腺毒症性心脏病表型。

Graves 病是由于机体产生了 TRAb, 与甲状腺上的 TSHR 结合, 刺激甲状腺, 导致甲状腺激素过量合成和分泌, 从而表现出甲状腺功能亢进的一系列症状^[27]。本研究检测小鼠血清 TRAb 和 TT4, 发现 pcDNA3.1-TSHR A 和 pTriEx1.1-TSHR

A 早期即可引起 TRAb 升高, 并最终分别诱导 73.3% 和 91.7% 的小鼠出现 Graves 病甲亢表型, 符合 Graves 病在人体发展模式。此外, 和之前的研究一样^[14, 24], 本研究观察到了甲状腺滤泡上皮增生伴淋巴细胞浸润。而之前在 KANEDA 等^[13]使用 pC1-IRES-ΔCD4 和 pBacMam-2 作为载体的模型中没有观察到淋巴细胞浸润, 说明不同质粒作为载体的造模效果可能并不一致, 而 pcDNA3.1 和 pTriEx1.1 诱导的模型更接近人体的病理变化。

此外, 本研究首次报道了质粒电穿孔诱导的 Graves 病模型的心脏超声改变, pTriEx1.1-TSHR A 组小鼠跟对照组和 pcDNA3.1-TSHR A 组相比, 有更高的左心室质量。左心室质量的升高提示存在左心室心肌肥厚, 符合甲状腺毒症性心脏病

早期的表现。其他检测指标并未显示出差异,可能是由于检查是在麻醉下进行的,其他指标受麻醉影响可能无法反映真实水平^[28]。pcDNA3.1-TSHR A 和 pTriEx1.1-TSHR A 造模小鼠心脏超声的差异再次证明不同质粒作为载体的造模效果可能并不一致,在诱导甲状腺毒症性心脏病方面 pTriEx1.1-TSHR A 的效能优于 pcDNA3.1-TSHR A。

本研究还检测了眼眶的病理,在 pcDNA3.1-TSHR A 组和 pTriEx1.1-TSHR A 组小鼠中均观察到眼外肌中纤维化改变,并非所有表现出甲亢表型的小鼠均出现了眼病表型。Graves 眼病可能和胰岛素样生长因子 1 受体 (insulin-like growth factor 1 receptor, IGF1R) 抗体的产生有关^[29]。虽然本研究中并未检测,但之前的研究表明使用 pcDNA3.1 和 pTriEx1.1 作为载体时,小鼠体内产生 TRAb 和 IGF1R 抗体并不是平行的^[14],因此并非所有甲亢小鼠都出现眼病。

值得注意的是,血清 TT4 的检测及组织病理学检查的结果显示 pTriEx1.1 作为 TSHR A 亚单位的载体在诱导 Graves 病甲亢表型和眼病表型方面有优于 pcDNA3.1 的趋势。本次研究的结果并未显示统计学意义,考虑可能与实验样本量不足有关,未来将增加实验小鼠只数进一步比较两种质粒诱导 Graves 病模型的效果。此外,本研究由于取材的失误,并未取得足够的甲状腺和眼眶组织样本,这可能是导致组织学检查没有显著性差异的原因。

总的来说,本研究表明 pcDNA3.1 和 pTriEx1.1 作为 TSHR A 亚单位的载体都在电穿孔的辅助下通过重复 4 次注射能够诱导小鼠出现 Graves 病甲亢表型及眼病表型,并首次报道了使用 pTriEx1.1 作为载体时可以同时诱导出甲状腺毒症性心脏病表型。以质粒作为表达载体诱导 Graves 病的模型极好地模拟了 Graves 病在人体的发病过程,可以作为将来 Graves 病研究的可靠方法。

参 考 文 献 (References)

[1] ROSS D S, BURCH H B, COOPER D S, et al. 2016 American thyroid association guidelines for diagnosis and management of hyperthyroidism and other causes of thyrotoxicosis [J]. *Thyroid*, 2016, 26(10): 1343-1421.

[2] SMITH T J, HEGEDUS L. Graves' disease [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(16): 1552-1565.

[3] LEE S Y, PEARCE E N. Hyperthyroidism: a review [J]. *JAMA*, 2023, 330(15): 1472-1483.

[4] 滕卫平, 单忠艳, 孙殿军, 等. 甲状腺学 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社; 2021.

TENG W P, SHAN Z Y, SUN D J, et al. *Thyroidology* [M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Press; 2021.

[5] BAHN R S. Graves' ophthalmopathy [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(8): 726-738.

[6] ABRAHAM P, AVENELL A, MCGEOCH S C, et al. Antithyroid drug regimen for treating Graves' hyperthyroidism [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2010, 1: CD003420.

[7] VITTI P, RAGO T, CHIOVATO L, et al. Clinical features of patients with Graves' disease undergoing remission after antithyroid drug treatment [J]. *Thyroid*, 1997, 7(3): 369-375.

[8] ALLAHABADIA A, DAYKIN J, HOLDER R L, et al. Age and gender predict the outcome of treatment for Graves' hyperthyroidism [J]. 2000, 85(3): 1038-1042.

[9] KAHALY G J. Management of Graves thyroidal and extrathyroidal disease: an update [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2020, 105(12): 3704-3720.

[10] CHEN C R, 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.

[11] ZHANG M, DING X, WU L P, et al. A promising mouse model of Graves' orbitopathy induced by adenovirus expressing thyrotropin receptor A subunit [J]. *Thyroid*, 2021, 31(4): 638-648.

[12] 伍丽萍, 施秉银, 旬利茹, 等. Graves 病动物模型诱导方法及持续时间的探讨 [J]. *中华内科杂志*, 2012, 51(10): 793-797.

WU L P, SHI B Y, XUN L R, et al. An exploration of induction methodology and experimental duration of Graves disease animal model [J]. *Chin J Intern Med*, 2012, 51(10): 793-797.

[13] KANEDA T, HONDA A, HAKOZAKI A, et al. An improved Graves' disease model established by using *in vivo* electroporation exhibited long-term immunity to hyperthyroidism in BALB/c mice [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(5): 2335-2344.

[14] ZHAO S X, TSUI S, CHEUNG A, et al. Orbital fibrosis in a mouse model of Graves' disease induced by genetic immunization of thyrotropin receptor cDNA [J]. *J Endocrinol*, 2011, 210(3): 369-377.

- [15] PHILIPP S, HORSTMANN M, HOSE M, et al. An early wave of macrophage infiltration intertwined with antigen-specific proinflammatory T cells and browning of adipose tissue characterizes the onset of orbital inflammation in a mouse model of Graves' orbitopathy [J]. *Thyroid*, 2022, 32(3): 283–293.
- [16] PARK M, BANGA J P, KIM G J, et al. Human placenta-derived mesenchymal stem cells ameliorate orbital adipogenesis in female mice models of Graves' ophthalmopathy [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 246.
- [17] SCHLÜTER A, ECKSTEIN A K, BRENZEL A, et al. Noninflammatory diffuse follicular hypertrophy/hyperplasia of Graves disease; morphometric evaluation in an experimental mouse model [J]. *Eur Thyroid J*, 2018, 7(3): 111–119.
- [18] PARK M, KIM J Y, KANG J M, et al. PRL-1 overexpressed placenta-derived mesenchymal stem cells suppress adipogenesis in Graves' ophthalmopathy through SREBP2/HMGCR pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 304.
- [19] MASETTI G, MOSHKELGOSHA S, KÖHLING H L, et al. Gut microbiota in experimental murine model of Graves' orbitopathy established in different environments may modulate clinical presentation of disease [J]. *Microbiome*, 2018, 6(1): 97.
- [20] SCHLÜTER A, HORSTMANN M, DIAZ-CANO S, et al. Genetic immunization with mouse thyrotrophin hormone receptor plasmid breaks self-tolerance for a murine model of autoimmune thyroid disease and Graves' orbitopathy [J]. *Clin Exp Immunol*, 2018, 191(3): 255–267.
- [21] ENDO T, KOBAYASHI T. Immunization of mice with a newly identified thyroid-stimulating hormone receptor splice variant induces Graves'-like disease [J]. *J Autoimmun*, 2013, 43: 18–25.
- [22] MOSHKELGOSHA S, SO P W, DEASY N, et al. Cutting edge: retrobulbar inflammation, adipogenesis, and acute orbital congestion in a preclinical female mouse model of Graves' orbitopathy induced by thyrotropin receptor plasmid-*in vivo* electroporation [J]. *Endocrinology*, 2013, 154(9): 3008–3015.
- [23] XIA N, YE X, HU X, et al. Simultaneous induction of Graves' hyperthyroidism and Graves' ophthalmopathy by TSHR genetic immunization in BALB/c mice [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0174260.
- [24] ZHENG W, WANG R, TAN J, et al. An improved method for the establishment of a model of Graves' disease in BALB/c mice [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(4): 1471–1478.
- [25] WANG X, LIU W, RUI Z, et al. Immunotherapy with a biologically active ICAM-1 MAb and an siRNA targeting TSHR in a BALB/c mouse model of Graves' disease [J]. *Endokrynol Pol*, 2021, 72(6): 592–600.
- [26] WU R, LI N, WANG X, et al. Mouse model of Graves' orbitopathy induced by the immunization with TSHR A and IGF-1R α subunit gene [J]. *J Endocrinol Invest*, 2024, 47(10): 2507–2519.
- [27] DAVIES T F, ANDERSEN S, LATIF R, et al. Graves' disease [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6(1): 53.
- [28] ROTH D M, SWANEY J S, DALTON N D, et al. Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 282(6): H2134–H2140.
- [29] SMITH T J. TSH-receptor-expressing fibrocytes and thyroid-associated ophthalmopathy [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2015, 11(3): 171–181.

[收稿日期] 2024–10–11