

网络出版时间: 2019-12-2 13:43 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20191126.1716.019.html>

◇预防医学研究◇

甲状腺功能紊乱对雌性小鼠血糖的短期影响

汪洋¹ 余婷¹ 陈可洋²

摘要 目的 探究甲状腺功能紊乱对4~8周雌性小鼠血糖变化的短期影响。方法 C57BL/6J 雌性小鼠适应性喂养1周后,将4周龄(青春期)小鼠随机分成3组:Pe组(甲状腺功能亢进组),Po组(甲状腺功能减退组),N组(正常对照组)。采用左旋甲状腺素灌胃诱导成为甲状腺功能亢进小鼠,丙基硫氧嘧啶灌胃诱导成为甲状腺功能减退小鼠。雌性小鼠体质量、空腹血糖每周测量1次。第8周使用ELISA试剂盒分析小鼠血清游离三碘甲状腺原氨酸(FT3)、游离四碘甲状腺原氨酸(FT4)。进行蛋白质印迹实验检测小鼠肝脏中的糖异生相关蛋白表达。结果 甲状腺功能亢进雌性小鼠青春期体质量增长较快,血糖水平降低。甲状腺功能减退雌性小鼠青春期体质量增长缓慢,血糖水平升高。甲状腺功能紊乱小鼠肝脏糖异生相关蛋白表达水平升高。结论 甲状腺功能紊乱的雌性青春期小鼠体质量、血糖、糖异生相关蛋白均受影响。该研究可能为女性青春期甲状腺功能紊乱的治疗提供新的视角。

关键词 甲状腺功能亢进;甲状腺功能减退;青春期;血糖

中图分类号 R 33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)12-1934-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.12.019

甲状腺功能紊乱(thyroid dysfunction, TD),即甲状腺功能亢进和甲状腺功能减退,女性比男性患病率高。女性青春期必需营养物质碘的需求增加,甲状腺激素对生长发育有重要意义。甲状腺激素在青春期生殖系统的适当发育和功能中发挥重要作用^[1]。甲状腺激素对生长也存在不可忽视的作用。目前研究^[2]提示青春期甲状腺激素水平与骨质发育有关联,青春期甲状腺功能亢进患者可严重影响青少年的骨代谢,导致骨转换加速,骨密度降低。

甲状腺激素在葡萄糖代谢中起重要作用。正常机体胰岛素分泌通过葡萄糖感受器调节,甲状腺激

素分泌同时影响胰岛素^[3]。三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine, T3)是生物活性激素,80%循环T3是活化的脱碘酶和单体碘化的四碘甲状腺原氨酸(thyroxine, T4)在外周转化而来,它主要负责葡萄糖代谢活动^[4]。

1 材料与方法

1.1 试剂与实验动物 3周龄C57BL/6J雌性小鼠(9~12g)30只,从北京维通利华(Vital River)公司购买。游离三碘甲状腺原氨酸(free triiodothyronine, FT3)、游离四碘甲状腺原氨酸(free thyroxine, FT4)试剂盒购于武汉伊莱瑞特生物科技有限公司;BCA蛋白定量试剂盒、RIPA裂解液购自江苏碧云天生物技术有限公司;葡萄糖-6-磷酸激酶(glucose-6-phosphatase, G6Pase)购自美国Thermo Scientific公司;磷酸烯醇式丙酮酸激酶(phosphoenol-pyruvate carboxykinase, PPEPCK)购自美国cell signaling technology公司;蛋白质印迹试验二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

试验前动物自由进食标准饲料,维持12h光照和12h黑暗的昼夜节律。实验室温度:20~25℃,湿度:(50±5)%。在上述环境适应1周后,将小鼠随机分成3组:N组(正常对照组)10只、Pe组(甲状腺功能亢进组)10只、Po组(甲状腺功能减退组)10只。

左旋甲状腺素配置成溶液,按1.2mg/kg灌胃处理小鼠28d,造甲状腺功能亢进模型;丙基硫氧嘧啶配置成溶液,按20mg/kg灌胃处理小鼠28d,造甲状腺功能减退模型。同时普通对照组动物灌胃等量生理盐水。实验期间动物自由进食、饮水,适应性喂养1周后每周测血糖水平及体质量至8周取材。

本实验严格遵循“NIH实验用动物管理和使用指南”,尽量减少实验动物痛苦和减少实验动物数量,禁止虐待动物。8周后,将从雌性小鼠获得的全血在3000r/min、4℃下离心20min以收集血清。获得的肝脏立即放入液氮中冷冻,并储存在-80℃待提取组织蛋白备用。

2019-07-26 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81570786)

作者单位:安徽医科大学公共卫生学院¹ 儿少卫生与妇幼保健学系、

² 卫生检验与检疫学系,合肥 230032

作者简介:汪洋,女,硕士研究生;

陈可洋,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: chenkeyang@ahmu.edu.cn

1.2 生化指标检测以及蛋白质印迹实验 甲状腺功能亢进、甲状腺功能减退小鼠在造模 28 d 后每组取 3 只,使用 ELISA 试剂盒分析血清 FT3、FT4 确保造模成功,同时 N 组取 3 只小鼠测相同指标作对照。蛋白质印迹试验检测肝脏组织中 G6Pase、PEP-CK 的表达水平。

通过蛋白质印迹试验测定靶蛋白的表达水平。用含有完全蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液制备肝匀浆。将裂解物在 12 000 r/min、4 °C 下离心 15 min。通过 BCA 测定法定量上清液提取物的蛋白质浓度。将蛋白质原液定量配制成上样缓冲液,100 °C 下 10 min 变性,然后放在 -20 °C 下保存。

对蛋白质进行分析,加入 30 ~ 50 μg 溶解的蛋白质,通过 10% ~ 15% SDS-PAGE 电泳分离(约 2 h)并转移至 PVDF 膜(约 2.5 h),然后将载有目的蛋白的 PVDF 膜在室温(25 °C)浸没于 5% 脱脂乳中孵育 1 h,纯水洗涤后与一抗 G6Pase、PEPCK 孵育。在摇床上过夜(4 °C)。然后 TBST 洗涤膜并在室温下与二抗孵育 1 ~ 2 h,通过增强化学发光(ECL)检测靶蛋白。为了量化蛋白质表达水平,在 Image J 软件上对应于每个样品的印迹强度获得密度测定的图下面积。即获得目的蛋白条带,分析比较不同组间的差异。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad prism 软件进行统计分析并得到图形,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 FT3、FT4 检测 造模 28 d 后,每组分别取 3 只小鼠测血中 FT3、FT4,以判断甲状腺功能亢进甲状腺功能减退造模是否成功。经试剂盒检测 N 组 FT3 浓度为 (55.40 ± 5.15) pmol/L,Pe 组 FT3 浓度为 (85.25 ± 5.35) pmol/L,Po 组 FT3 浓度为 (20.72 ± 2.23) pmol/L。N 组 FT4 浓度为 (58.41 ± 3.53) pmol/L,Pe 组 FT4 浓度为 (86.07 ± 2.39) pmol/L,Po 组 FT4 浓度为 (20.83 ± 2.50) pmol/L。与 N 组相比,Pe 组 FT3、FT4 水平升高($t = 4.02, P < 0.05$; $t = 6.49, P < 0.01$),Po 组 FT3、FT4 水平降低($t = 6.18, P < 0.01$; $t = 8.69, P < 0.01$)。见图 1。

2.2 体质量及血糖检测 造甲状腺功能亢进甲状腺功能减退模型从雌性小鼠青春期(4 周龄)起,Pe 组体质量从造模 21 d 逐渐与 Po 组、N 组拉开距离,生长加快。造模结束(28 d)N 组体质量 $(18.23 \pm$

$0.13)$ g,Pe 组体质量 (20.20 ± 0.56) g,Po 组体质量 (16.77 ± 0.23) g。与 N 组相比,Pe 组体质量水平升高($t = 3.45, P < 0.01$),Po 组体质量水平降低($t = 5.71, P < 0.01$)。

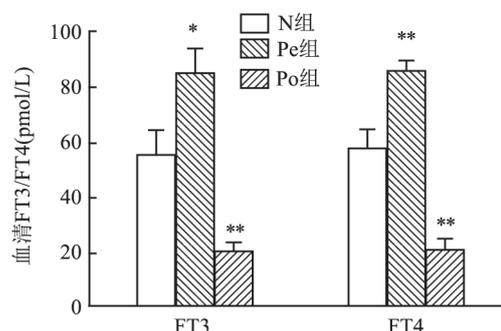


图 1 各组血清 FT3、FT4 检测
与 N 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

造甲状腺功能亢进甲状腺功能减退模型从雌性小鼠青春期(4 周龄)起,Pe 组血糖从造模 7 d 逐渐与 N 组、Po 组拉开距离,血糖降低;Po 组血糖从造模 14 d 逐渐与 N 组拉开距离,血糖升高。造模结束(28 d)N 组血糖 (5.23 ± 0.26) mmol/L,Pe 组血糖 (4.12 ± 0.22) mmol/L,Po 组血糖 (7.33 ± 0.58) mmol/L。与 N 组相比,Pe 组血糖水平降低($t = 3.30, P < 0.01$),Po 组血糖水平升高($t = 5.18, P < 0.01$)。甲状腺功能亢进鼠呈低血糖状态,甲状腺功能减退鼠呈高血糖状态,见图 2。

2.3 肝脏组织中 G6Pase、PEPCK 的表达 G6Pase 和 PEPCK 是催化糖原异生的决定性蛋白,因此在葡萄糖稳态中起关键作用。G6Pase 蛋白的表达在各组有差异。与 N 组相比,Pe 组蛋白表达水平升高($t = 8.50, P < 0.01$),Po 组体蛋白表达水平升高($t = 3.40, P < 0.05$)。PEPCK 蛋白的表达略有不同。与 N 组相比,Pe 组蛋白表达水平升高($t = 14.92, P < 0.01$),Po 组蛋白表达无差异($t = 2.43, P > 0.05$)。见图 3。

3 讨论

3.1 甲状腺激素对青春期生长的短期影响 甲状腺激素被称为代谢、生长发育的调节剂,促进雌性小鼠青春期生长。甲状腺功能亢进导致青春期雌性小鼠体质量增加迅速,甲状腺功能减退导致体质量增加缓慢。Shiraki et al^[5] 研究发现甲状腺功能减退导致体质量降低,Kiyohara et al^[6] 研究结果表明甲状腺功能减退状态可能对青春期发育产生负面影响,

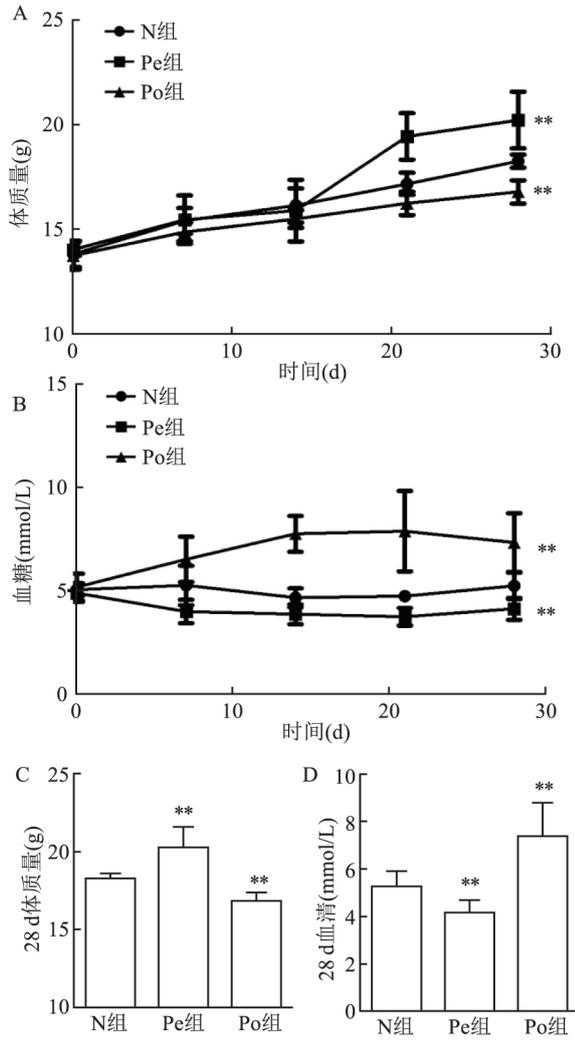


图2 体质量及血糖检测

A:造模期体质量;B:造模期血糖;C:造模28 d体质量;D:造模28 d血糖;与N组比较:* P<0.05,** P<0.01

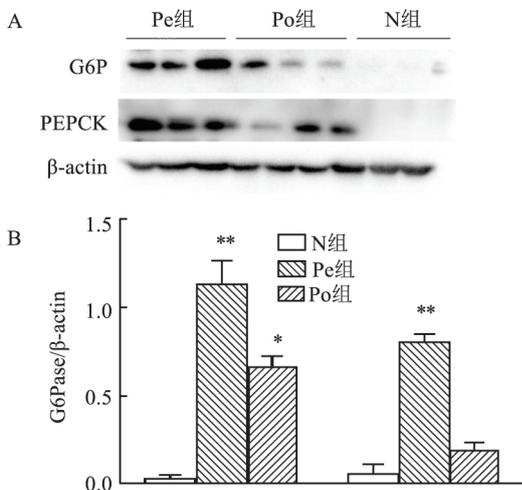


图3 肝脏组织中G6P、PEPCK的表达

A:肝脏组织中G6P、PEPCK的蛋白条带;B:肝脏组织中G6P、PEPCK各自与beta-actin的比值;与N组比较:* P<0.05,** P<0.01

体质量增长的变化与本研究结果一致。甲状腺激素紊乱对雌性小鼠不同生长阶段作用略有区别,有研究^[7]指出老年雌性甲亢小鼠体质量均降低,这可能是由于青春期促生长作用更明显。流行病学调查显示,儿童期缺乏甲状腺激素是矮小症患者发病的重要原因^[8]。研究^[1]表明下丘脑-垂体-甲状腺轴和下丘脑-垂体-性腺轴之间存在相互作用。青春期是重要的生长发育时期,甲状腺激素紊乱对其影响不仅仅体现在生长方面,而且对女性青春发动期的性腺发育及性器官成熟有重要意义。本研究的不足之处在于没有进一步探究对雌性小鼠青春发育的影响。

3.2 甲状腺激素与糖异生相关蛋白的表达 甲状腺激素与能量代谢的调节密切相关,与糖代谢的调节也是密不可分。甲状腺功能亢进状态下,葡萄糖氧化率增加,胰岛素敏感性降低^[9]。有研究^[10]表明甲状腺素可增加大鼠卵巢中葡萄糖转运蛋白4表达。甲状腺激素通过这些可能的途径影响糖代谢水平。

与N组相比,甲状腺功能亢进小鼠G6Pase蛋白表达水平升高($t = 8.50, P < 0.01$),PEPCK蛋白表达水平升高($t = 14.92, P < 0.01$)。这两种催化糖原异生的蛋白表达水平升高,糖异生增强。然而甲状腺功能亢进小鼠血糖水平却降低,可能是由于葡萄糖氧化率增加,葡萄糖转运蛋白表达水平提高导致糖异生的速度赶不上葡萄糖消耗的速度,能量用于生长所需以及维持加速的循环系统运转。

与N组相比,甲状腺功能减退小鼠G6Pase催化糖原异生的蛋白表达增强($t = 3.40, P < 0.05$),糖异生增强。同时甲状腺功能减退会降低胃肠道葡萄糖的吸收,肝脏葡萄糖生成几乎完全停止以及胰岛素水平增加^[9]。甲状腺功能减退小鼠血糖水平升高明显,可能是由于葡萄糖生成途径增加以及能量代谢减慢叠加的效果。

3.3 甲状腺激素与血糖水平的意义 一项对德国和奥地利276名儿童和青少年1型糖尿病(diabetes mellitus type 1, T1DM)患者的甲状腺功能亢进症调查表明,伴有甲状腺功能亢进的T1DM患者低血糖发生率更高^[11]。甲状腺功能亢进与胰岛素不足是否存在相关性值得引起注意,更高的低血糖发生率对伴有甲状腺功能亢进的T1DM患者并发症防治具有前瞻性意义。格雷夫斯眼病(自身免疫性甲状腺相关性眼病)患者存在自发性低血糖。青春期甲状腺功能亢进可能需预防低血糖的风险。

有队列研究^[12]表明甲状腺功能减退是新发糖尿病的危险因素。与 N 组相比,该研究中雌性小鼠的血糖水平升高($t = 5.18, P < 0.01$),青春期甲状腺功能减退存在发展成为 2 型糖尿病的潜在风险,高血糖的持续状态甚至可能影响雌性小鼠成年期。

甲状腺疾病对青春期女性的危害不容忽视。但甲状腺激素水平影响糖脂代谢的信号通路的哪些环节 相关分子机制需要进一步的探索。这或许为女性青春期甲状腺功能紊乱治疗提供新的视角。

参考文献

- [1] Kiyohara M, Son Y L. Involvement of gonadotropin-inhibitory hormone in pubertal disorders induced by thyroid status[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1042.
- [2] 陈瑶,王静. 青春期甲亢患者骨代谢特点分析[J]. *中国伤残医学*, 2014, 22(7): 115-6.
- [3] 张艳荣,刘静,王瑞英. 妊娠期甲状腺功能亢进症对胰岛β细胞功能及糖代谢的影响[J]. *医学综述*, 2015, 21(24): 4496-9.
- [4] Yang S, Shi F T, Leung P C, et al. Low thyroid hormone in early pregnancy is associated with an increased risk of gestational diabetes mellitus[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101(11): 4237-43.
- [5] Shiraki A, Saito F, Akane H, et al. Gene expression profiling of the hippocampal dentate gyrus in an adult toxicity study captures a variety of neurodevelopmental dysfunctions in rat models of hypothyroidism[J]. *J Appl Toxicol* 2016, 36(1): 24-34.
- [6] Kiyohara M, Son Y L, Tsutsui K. Involvement of gonadotropin-inhibitory hormone in pubertal disorders induced by thyroid status[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1042.
- [7] Rakov H, Engels K, Hönes G S, et al. Sex-specific phenotypes of hyperthyroidism and hypothyroidism in aged mice[J]. *Biol Sex Differ*, 2017, 8(1): 38.
- [8] 朱新宇. 矮小症患儿的发病原因及其骨龄分析[J]. *临床合理用药杂志*, 2018, 11(36): 124-5.
- [9] Martinez B. Thyroid hormone regulation and insulin resistance: insights from animals naturally adapted to fasting[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2017, 32(2): 141-51.
- [10] Ding Y, Tian Y, Guo M, et al. Regulation of glucose transport by thyroid hormone in rat ovary[J]. *Cell Tissue Res*, 2016, 366(2): 455-66.
- [11] Dost A, Rohrer T R, Fröhlich-Reiterer E, et al. Hyperthyroidism in 276 children and adolescents with type 1 diabetes from Germany and Austria[J]. *Horm Res Paediatr*, 2015, 84(3): 190-8.
- [12] Gronich N, Deftereos S N, Lavi I, et al. Hypothyroidism is a risk factor for new-onset diabetes: a cohort study[J]. *Diabetes Care*, 2015, 38(9): 1657-64.

Short-term effects of thyroid dysfunction on blood glucose in female mice

Wang Yang¹, Yu Ting¹, Chen Keyang²

(¹Maternal, Child and Adolescent Health, ²Dept of Inspection and Quarantine Health, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the short-term effects of thyroid dysfunction on blood glucose changes in female mice from 4 th to 8 th week of age. **Methods** C57BL/6J female mice were kept under observation for one week to acclimatize the animals to the new conditions. 4 week old (puberty) mice were randomly divided into 3 groups: Pe group (hyperthyroidism group), Po group (hypothyroidism group), and N group (normal control group). Levothyroxine (LT4) gavage administration developed Group Pe to become hyperthyroidism mice. propylthiouracil (PTU) gavage administration developed Group Po to become hypothyroid mice. The weight of female puberty mice, fasting blood glucose, food intake are measured once a week. Mouse serum free triiodothyronine (FT3), free thyroxine (FT4), respectively determined by ELISA kits with 8 weeks of age. Western blot was conducted to detect Glycogen-related protein expression in the liver of the mice. **Results** The body weight of hyperthyroidism female mice during the puberty increased quickly and blood glucose levels decreased. The body weight of hypothyroidism female mice during the puberty increased slowly and blood glucose levels increased. Liver Glycogen-related protein expression was improved. **Conclusion** Thyroid dysfunction with the blood glucose and glycogen-related protein is adversely affected in female puberty mice, growth is limited. The findings may provide a new perspective for Female puberty thyroid dysfunction treatment.

Key words hyperthyroidism; hypothyroidism; puberty; glucose in blood