

BALB/c 小鼠格雷夫斯病模型靶向 TSHR 和 ICAM-1 治疗的研究

郑薇¹ 王莹¹ 李宁¹ 刘金剑² 王深¹ 谭建¹ 贾强¹ 孟召伟¹ 芮忠颖¹

¹天津医科大学总医院核医学科,天津 300052;²中国医学科学院放射医学研究所,天津 300192

通信作者:郑薇, Email: zhengw@tmu.edu.cn

【摘要】 目的 探讨靶向促甲状腺激素受体(TSHR)和细胞间黏附分子-1(ICAM-1)治疗格雷夫斯病(GD)的新方法。方法 设计合成 TSHR 的小干扰 RNA (siRNA) 及 ICAM-1 单克隆抗体(mAb)。30 只 GD 模型鼠按随机数字表法分为 siRNA 治疗组、ICAM-1 mAb 治疗组及未治疗组,另取 10 只正常小鼠作为空白对照。治疗前、后测定小鼠血清甲状腺素(T_4)、促甲状腺激素(TSH)、TSH 受体刺激性抗体(TSAb)、TSH 刺激阻断性抗体(TSBAb)水平,治疗结束后测定各组小鼠体质量、心率,评估甲状腺摄取 $^{99}\text{Tc}^m\text{O}_4^-$ 能力、甲状腺大小及病理变化。采用两独立样本 *t* 检验、配对 *t* 检验及单因素方差分析处理数据。结果 3 次治疗后,siRNA 组、ICAM-1 mAb 组小鼠体质量均低于正常小鼠($F=3.50$, $P=0.025$),心率均低于未治疗组 GD 模型鼠($F=24.73$, $P<0.001$),其中 siRNA 组心率下降明显,接近正常小鼠。3 次治疗后,siRNA 组、ICAM-1 mAb 组小鼠血清 T_4 [(27.58±1.94)、(27.24±3.50) μg/L]、TSAb [(331.44±43.38)、(275.16±45.80) mU/L]、TSBAb [(13.94±1.11)、(14.59±1.02) mU/L] 水平均较治疗前明显下降 [T_4 : (65.71±6.89)、(70.84±8.46) μg/L, TSAb: (457.33±45.85)、(443.91±42.32) mU/L, TSBAb: (15.83±5.92)、(17.05±6.16) mU/L; *t* 值: 4.45~10.87, 均 $P<0.05$] , 2 组小鼠血清 TSH 水平 [(0.13±0.05)、(1.46±0.34) mU/L] 均较治疗前明显上升 [(0.04±0.05)、(0.06±0.03) mU/L; *t* 值: -2.22、-5.87, P 值: 0.007、<0.001], ICAM-1 mAb 组小鼠 TSH 升高幅度及 TSAb 降低幅度高于 siRNA 组 (*t* 值: 1.03、-1.63, P 值: 0.002、0.031)。治疗后 siRNA 组、ICAM-1 mAb 组小鼠均见甲状腺部分腺叶摄取 $^{99}\text{Tc}^m\text{O}_4^-$ 能力减低,相应腺叶肿大程度缩小。治疗组小鼠甲状腺病理可见甲状腺滤泡吸收空泡减少,胶质稀薄现象有所改善。小鼠心、肝、肾病理未见明显损伤。结论 靶向 TSHR 的 siRNA 及 ICAM-1 mAb 均对 GD 模型鼠有治疗作用,在控制心率方面 siRNA 效果更好,在升高 TSH 及降低 TSAb 方面 ICAM-1 mAb 效果更好。上述治疗方法安全、有效,可以为 GD 的靶向治疗提供新思路。

【关键词】 格雷夫斯病;RNA,小分子干扰;受体,促甲状腺素;抗体,单克隆;胞间黏附分子 1;疾病模型,动物;小鼠

基金项目:国家自然科学基金(81601523);天津市卫生健康科技项目(ZC20181);天津医科大学总医院青年孵育基金(ZYYFY2019027)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20200824-00322

Targeting TSHR and ICAM-1 for treatment of Graves' disease in BALB/c mice

Zheng Wei¹, Wang Xuan¹, Li Ning¹, Liu Jinjian², Wang Shen¹, Tan Jian¹, Jia Qiang¹, Meng Zhaowei¹, Rui Zhongying¹

¹Department of Nuclear Medicine, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China;

²Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Zheng Wei, Email: zhengw@tmu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To explore new methods of treating Graves' disease (GD) by targeting thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). **Methods** The small interfering RNA (siRNA) targeting TSHR and the ICAM-1 monoclonal antibody (mAb) were designed and synthesized. Thirty GD model mice were randomly divided into siRNA treatment group, ICAM-1 mAb treatment group, and untreated GD group (10 mice in each group), and 10 normal mice were taken as blank control. Serum thyroxine (T_4), thyroid stimulating hormone (TSH), TSH receptor-stimulating antibody (TSAb) and TSH-stimulation blocking antibody (TSBAb) were measured before and after treatment. At the end of the treatment, body mass and heart rate of mice in each group were measured, and thyroid uptake of $^{99}\text{Tc}^m\text{O}_4^-$, thyroid size and pathological changes were evaluated. Independent-sample *t* test, paired *t* test and one-way analysis of variance were used to analyze data. **Results** After three treatments, the body

mass of mice in siRNA group and ICAM-1 mAb group were significantly lower than that of normal mice ($F=3.50$, $P=0.025$); the heart rates of the mice in two groups were significantly lower than that of untreated GD mice ($F=24.73$, $P<0.001$). Heart rate of mice treated with siRNA decreased significantly, close to that of normal mice. After treatment, the serum T_4 ((27.58 ± 1.94) vs (65.71 ± 6.89) $\mu\text{g/L}$, (27.24 ± 3.50) vs (70.84 ± 8.46) $\mu\text{g/L}$), TSAb ((331.44 ± 43.38) vs (457.33 ± 45.85) mU/L , (275.16 ± 45.80) vs (443.91 ± 42.32) mU/L) and TSBAb ((13.94 ± 1.11) vs (15.83 ± 5.92) mU/L , (14.59 ± 1.02) vs (17.05 ± 6.16) mU/L) levels of mice in both siRNA group and ICAM-1 mAb group significantly decreased (t values: 4.45–10.87, all $P<0.05$), while the serum TSH levels of mice in two groups significantly increased ((0.13 ± 0.05) vs (0.04 ± 0.05) mU/L , (1.46 ± 0.34) vs (0.06 ± 0.03) mU/L ; t values: -2.22, -5.87, P values: 0.007, < 0.001). The elevated TSH level and decreased TSAb level of mice treated with ICAM-1 mAb were significantly different from those treated with siRNA (t values: 1.03, -1.63, P values: 0.002, 0.031). After treatment, the uptake of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ in part of the thyroid lobes of mice was decreased, and the enlargement degree of the corresponding lobes was reduced. The thyroid pathology of mice in the treated groups showed that the absorption vacuoles of thyroid follicles were reduced, and the phenomenon of thinner colloids was improved. No obvious damage was observed in the heart, liver and kidneys of the mice. **Conclusions** Both the siRNA targeting TSHR and ICAM-1 mAb have therapeutic effects on GD model mice. The siRNA is better at controlling heart rate, and ICAM-1 mAb is better at increasing TSH and decreasing TSAb. Each of the above treatment methods is safe and effective, which can provide new ideas for GD targeted therapy.

【Key words】 Graves disease; RNA, small interfering; Receptors, thyrotropin; Antibodies, monoclonal; Intercellular adhesion molecule-1; Disease models, animal; Mice

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81601523); Health Science and Technology Project of Tianjin (ZC20181); Youth Incubation Fund of Tianjin Medical University General Hospital (ZYYFY2019027)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20200824-00322

格雷夫斯病(Graves' disease, GD)是自身免疫性甲状腺病最常见的类型。目前 GD 治疗主要针对缓解患者的症状和体征,而非纠正病因。为深入研究 GD 病因、发病机制及靶向性更好的 GD 治疗方法,本研究用靶向促甲状腺激素受体(thyroid stimulating hormone receptor, TSHR)的小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)及细胞间黏附分子 1(intracellular adhesion molecule-1, ICAM-1)单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb)分别对 BALB/c 小鼠 GD 模型进行靶向治疗,从病因学角度对 GD 的发生、发展、转归及治疗策略进行深入研究。

材料与方法

一、实验材料与仪器

人正常甲状腺细胞 Nthy-ori-3-1 购自上海慧颖生物科技有限公司。70 只 BALB/c 雌性小鼠[6~8 周龄, 体重 18~20 g, 无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级]购自中国医学科学院医学实验动物研究所[许可证号:SYXK(京)2015-0035]。动物实验经天津医科大学总医院实验动物福利伦理委员会批准(批件号:IRB2020-DW-12)。siRNA 由宝生物工程(大连)有限公司合成。ICAM-1 mAb 由天津医科大学总医院实验室制备及保存^[1]。甲状腺素(thyroxine, T_4)纸片法放射免疫测定试剂盒和促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH)纸片法免疫放射测定试剂盒均购自北京北方生物技术研

究所。TSHR 刺激性抗体(TSHR-stimulating antibody, TSAb)、TSH 刺激阻断性抗体(TSH-stimulation blocking antibody, TSBAb)酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒由天津医科大学总医院实验室研制^[2]。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 由中国原子能科学研究院钼铈发生器制备。ECM830 电穿孔仪购自美国 BTX 公司。小鼠无创血压计(BP-2010)购自日本 Softron 公司。临床前小动物 SPECT/CT(Nano SCAN)购自匈牙利 Mediso 公司。BALB/c 小鼠 GD 模型由天津医科大学总医院实验室构建^[3-5]。

二、研究方法

1. BALB/c 小鼠 GD 模型的构建。按照随机数字表法选择 50 只小鼠,参照文献[3-5],每间隔 3 周在小鼠双侧腓肠肌注射重组质粒 pcDNA 3.1/TSHR 289,并在注射部位电穿孔,共 4 次,构建 BALB/c 小鼠 GD 模型。其余 20 只小鼠正常饲养。

2. siRNA 的合成及特性鉴定。根据 GeneBank 公布的 TSHR 基因序列,利用 ambion 在线设计 2 个 TSHR 同源序列 siRNA 并进行合成:(1) siRNA 1012:正序 ACAAACUCCAAGUCCAGtt,反序 CUGGAACUUGGAGUUUGUtt;(2) siRNA 1041:正序 GCAACUCUCACUAUUACGUtt,反序 ACGUAAUA-GUGAGAGUUGCtt。分别转染至 Nthy-ori-3-1 细胞后提取蛋白质。采用蛋白质免疫印迹法检测转染前后 TSHR 表达水平。

3. 实验分组及模型小鼠的治疗。按随机数字表

法选出造模成功小鼠 30 只,随机(方法同上)分为 3 组 (siRNA 治疗组、ICAM-1 mAb 治疗组及未治疗组), 每组 10 只。从 20 只正常饲养的小鼠中随机(方法同上)选择 10 只作为空白对照。

3 组小鼠结束 4 次免疫后,自第 13 周开始,每隔 3 周强化免疫 1 次至第 18 周实验结束。

自第 12 周开始,siRNA 组小鼠腹腔注射 siRNA 60 μg /只,每 48 h 给药 1 次,共 3 次(2 种 siRNA 按照 1:1 混合给药);ICAM-1 mAb 组小鼠腹腔注射 ICAM-1 mAb 10 μg /只,每 48 h 给药 1 次,共 3 次。siRNA 及 ICAM-1 mAb 均溶于生理盐水中,体积 200 μl ;未治疗组小鼠仅进行每 3 周 1 次的强化免疫。免疫及治疗方案见图 1。

4. 体质量及心率测定。于治疗结束后第 6 周(实验第 18 周)测量每组小鼠体质量及心率。测量心率前将小鼠前半身置于鼠网内放入保温筒,保温袋包裹,保温筒温度设为 39.5 $^{\circ}\text{C}$,将小鼠加压感应器置于鼠尾根部进行测量。

5. 血清学指标测定。于第 12 周、18 周取小鼠内眦静脉血测定血清 T_4 、TSH 及 TSAb、TSBAb 水平。血清指标测定方法参见文献[3]。

6. 甲状腺 SPECT/CT 显像。于治疗结束后第 6 周(实验第 18 周)行甲状腺 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 显像。小鼠异氟烷(体积分数 3%)吸入式麻醉后,用异氟烷(体积分数 2%)维持麻醉,腹腔注射 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 37 MBq (3.7×10^5 MBq/L),俯卧位固定,10 min 后采集图像。

7. 病理学分析。实验结束后,脊髓离断处处死小鼠,取甲状腺、心、肝、肾组织,质量分数 4% 甲醛溶液固定后制作组织切片,行 HE 染色,光学显微镜下观察病理变化。

8. 统计学处理。采用 IBM SPSS 25.0 软件进行数据分析。符合正态分布的定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用两独立样本 t 检验,治疗前后比较采用配对 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析及最小显著差异 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. Nthy-ori-3-1 细胞转染 siRNA 后 TSHR 表达情况。转染 siRNA 后 24 h,细胞中 TSHR 表达水平明显下降,证实合成的 siRNA 对 TSHR 有抑制作用。

2. 小鼠体质量、心率变化。第 4 次免疫结束后 2 周(第 12 周),50 只小鼠中 41 只出现 T_4 、TSAb、TSBAb 升高,TSH 降低,同时伴有体质量增长缓慢、甲状腺摄取 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 能力增强^[4-6]。建模成功率为 82% (41/50)。3 次治疗后,siRNA 组、ICAM-1 mAb 组及未治疗组 GD 小鼠体质量均明显低于正常小鼠 [(23.87 \pm 3.41) g、(24.28 \pm 3.43) g、(24.11 \pm 2.91) g 与 (27.56 \pm 1.72) g; $F = 3.50, P = 0.025$]。siRNA 组、ICAM-1 mAb 组治疗后小鼠心率均明显低于未治疗组小鼠 [(384.70 \pm 54.50)、(409.90 \pm 70.35) 与 (544.40 \pm 62.62) 次/min; $F = 24.73, P < 0.001$]。其中 siRNA 组下降更为明显,虽仍高于正常小鼠 [(327.70 \pm 42.41) 次/min],但差异无统计学意义 ($t = 3.39, P = 0.059$);ICAM-1 mAb 组仍明显高于正常小鼠 ($t = 6.11, P = 0.020$)。

3. 小鼠血清学指标变化。治疗前 3 组 GD 小鼠和正常小鼠的血清 T_4 、TSH、TSAb、TSBAb 水平间差异均有统计学意义 (F 值:9.45~21.75,均 $P < 0.05$),3 组 GD 小鼠间各血清学指标差异均无统计学意义 (t 值:-4.87~5.45,均 $P > 0.05$),3 组 GD 小鼠的血清 T_4 、TSAb、TSBAb 水平均明显高于正常小鼠 (t 值:3.34~

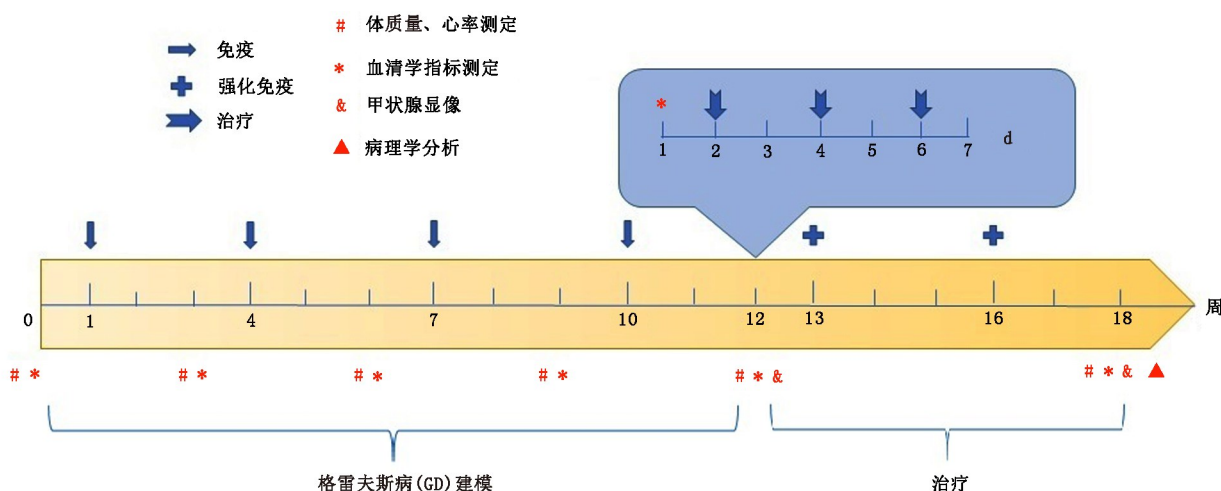


图 1 BALB/c 小鼠免疫、治疗及检测方案

6.18, 均 $P < 0.05$), TSH 水平均明显低于正常小鼠 (t 值: $-2.12 \sim -1.70$, 均 $P < 0.05$)。

3 次治疗后, 各组小鼠血清 T_4 、TSH、TSAb、TSBAb 水平变化情况如下: (1) T_4 水平。siRNA 组及 ICAM-1 mAb 组小鼠血清 T_4 水平分别由 (65.71 ± 6.89) 、 (70.84 ± 8.46) $\mu\text{g/L}$ 下降至 (27.58 ± 1.94) 、 (27.24 ± 3.50) $\mu\text{g/L}$ (t 值: 5.88 、 4.45 , P 值: 0.021 、 0.018), 低于未治疗组 GD 小鼠 [(69.03 ± 2.72) $\mu\text{g/L}$; $F = 17.58$, $P < 0.001$, t 值: -4.59 、 -2.36 , P 值: 0.002 、 0.007], 但仍高于正常小鼠 [(13.97 ± 1.41) $\mu\text{g/L}$; t 值: 3.12 、 1.55 , P 值: 0.006 、 0.010], 2 个治疗组间 T_4 水平的差异无统计学意义 ($t = 1.85$, $P = 0.542$)。

(2) TSH 水平。siRNA 组及 ICAM-1 mAb 组小鼠血清 TSH 水平分别由 (0.04 ± 0.05) 、 (0.06 ± 0.03) mU/L 上升至 (0.13 ± 0.05) 、 (1.46 ± 0.34) mU/L (t 值: -2.22 、 -5.87 , P 值: 0.007 、 < 0.001), 高于未治疗组 GD 小鼠 [(0.04 ± 0.03) mU/L; $F = 28.16$, $P < 0.001$, t 值: 3.12 、 2.64 , P 值: 0.021 、 0.003], 但仍低于正常小鼠 [(4.61 ± 0.28) mU/L; t 值: -4.40 、 -2.17 , P 值: 0.004 、 0.001]。治疗后 ICAM-1 mAb 组 TSH 上升幅度明显高于 siRNA 组 ($t = 1.03$, $P = 0.002$)。

(3) TSAb 及 TSBAb 水平。siRNA 组及 ICAM-1 mAb 组小鼠血清 TSAb 水平分别由 (457.33 ± 45.85) 、 (443.91 ± 42.32) mU/L 下降至 (331.44 ± 43.38) 、 (275.16 ± 45.80) mU/L (t 值: 7.79 、 9.01 , P 值: < 0.001 、 0.002); 血清 TSBAb 水平分别由 (15.83 ± 5.92) 、 (17.05 ± 6.16) mU/L 下降至 (13.94 ± 1.11) 、 (14.59 ± 1.02) mU/L (t 值: 10.87 、 8.08 , P 值: 0.001 、 < 0.001), 均低于未治疗组 GD 小鼠 [TSAb: (504.84 ± 42.77) mU/L, TSBAb: (17.14 ± 2.76) mU/L; F 值: 15.42 、 14.64 , t 值: $-2.44 \sim -1.47$, 均 $P < 0.05$], 但仍高于正常小鼠 [TSAb: (6.37 ± 1.86) mU/L, TSBAb: (5.94 ± 3.72) mU/L; t 值: $1.34 \sim 3.28$, 均 $P < 0.05$]。治疗后 ICAM-1 mAb 组 TSAb 下降幅度明显高于 siRNA 组 ($t = -1.63$, $P = 0.031$), 2 组间血清 TSBAb 水平差异无统计学意义 ($t = -2.48$, $P = 0.184$)。

4. 甲状腺 SPECT/CT 显像 (图 2A)。甲状腺 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 显像显示, 未治疗组 GD 小鼠摄取能力最强, siRNA 组、ICAM-1 mAb 组摄取能力明显高于正常小鼠, 但 2 组与未治疗组 GD 小鼠比较, 均可见部分腺叶摄取能力减低。

5. 小鼠甲状腺形态及重要器官病理学分析 (图 2B, 2C)。3 次治疗后, 与未治疗组 GD 小鼠及正常小鼠比较, 2 个治疗组小鼠甲状腺均可见相应的形

态学及病理学改变。各组小鼠心、肝及肾等重要器官均未见明显损伤。

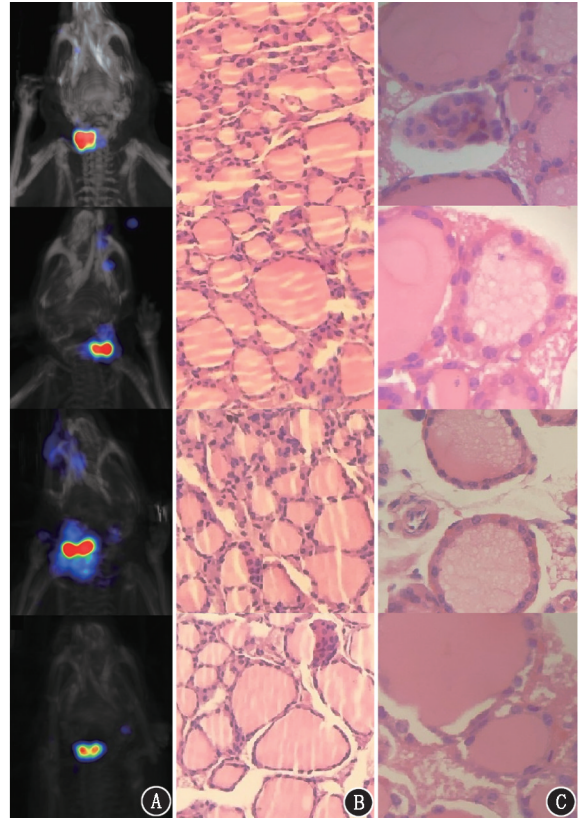


图 2 小干扰 RNA (siRNA) 治疗组、细胞间黏附分子单克隆抗体 (ICAM-1 mAb) 治疗组、未治疗组格雷夫斯病 (GD) 小鼠及正常小鼠 (从上到下) 甲状腺显像及病理图。A. 甲状腺 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 显像。siRNA 组、ICAM-1 mAb 组 GD 小鼠甲状腺摄取 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 能力明显高于正常小鼠, 但与未治疗组 GD 小鼠比较, 部分腺叶摄取能力减低; B. 甲状腺病理图 (HE $\times 100$)。siRNA 组、ICAM-1 mAb 组与未治疗组 GD 小鼠甲状腺均可见局部微滤泡, 其内部胶质稀薄, 滞留不明显, 滤泡上皮细胞增生, 部分可见高柱状改变; C. 甲状腺病理图 (HE $\times 400$)。正常小鼠甲状腺滤泡内胶质均匀, GD 小鼠甲状腺滤泡内可见胶质稀薄、大量吸收空泡形成, 2 个治疗组 GD 小鼠甲状腺仅有部分滤泡内可见胶质稀薄、吸收空泡形成

讨 论

GD 病因及发病机制尚不明确, 国内外对该病研究多集中在 TSHR 方面, 认为 TSHR 是 GD 的自身抗原, 在 GD 的发病及进展中至关重要^[6]。选择一种拮抗剂, 通过与 TSHR 结合而对其进行抑制, 是非常有前途的治疗手段。本实验设计的 siRNA 可抑制 TSHR 的表达, 将其转染至 Nthy-ori-3-1 细胞后, TSHR 蛋白水平明显下降。

GD 患者在自身抗体的持续刺激下, 甲状腺细胞表面有 ICAM-1 大量表达, ICAM-1 mAb 可阻断

ICAM-1 与其配体的结合,从而抑制 T 细胞活化及效应细胞与靶细胞间的相互作用,继而达到治疗 GD 的目的,这也是本研究用 ICAM-1 mAb 对 GD 模型小鼠进行治疗的原因。

有研究表明,GD 患者血清免疫球蛋白可通过 TSHR 介导促进 ICAM-1 表达,提示 ICAM-1 在 GD 的发病机制中具有重要作用。而 TSH 受体抗体 (TSH receptor antibody, TRAb) 及可溶性 ICAM-1 (soluble ICAM-1, sICAM-1) 均可被用于评价 GD 及格雷夫斯眼病的疾病进展、严重程度、病程,且在部分研究中,由于 sICAM-1 在 GD 治疗过程下降缓慢,其对于疾病复发的预测效果要优于 TRAb^[7]。故本研究选择这 2 种方法,从基因治疗及免疫抑制 2 个方面对 GD 模型小鼠进行实验性治疗,为下一步的联合治疗积累经验。

在治疗中,为了模拟 GD 患者持续存在的甲状腺功能亢进(简称甲亢)状态,同时排除停止免疫后 GD 模型小鼠甲亢状态的自发性改善,本研究在常规 4 次免疫构建 BALB/c 小鼠 GD 模型成功后,每隔 3 周进行强化免疫,使 GD 模型小鼠持续处于甲亢状态,在此基础上验证 2 种治疗方法的有效性。

经过为期 1 周的 3 次治疗,2 组接受治疗的小鼠均可观察到 T₄、TSAb、TSBAb 明显下降及 TSH 显著上升。虽然未能恢复至正常小鼠的水平,但较 GD 未治疗组小鼠有明显改善。此外,2 组小鼠的体质量和心率也与正常小鼠更为接近。治疗组小鼠的甲状腺仍肿大,但两侧腺叶肿大程度不一致,较小侧腺叶摄取^{99m}Tc^mO₄ 的能力较对侧腺叶减低,考虑符合治疗后改变。以上表明,siRNA 和 ICAM-1 mAb 均对 GD 有一定的治疗作用。进一步比较 2 种方法的疗效,siRNA 控制心率效果更好,而 ICAM-1 mAb 在升高 TSH 及降低 TSAb 方面更有优势。作为靶向 TSHR 治疗的 siRNA,降低 TSAb 并无优势,可能是由于 TSHR 基因有多个结合位点,本研究只针对其中一些位点设计并筛选出效果相对较好的 siRNA,不排除 TSHR 其他靶点仍发挥作用,siRNA 腹腔注射后部分脱靶的可能性,也可能与治疗剂量及疗程有关,最佳治疗剂量及疗程仍需进一步探索。

本研究中 2 个治疗组小鼠甲状腺切片均可见 GD 特有的甲状腺滤泡上皮胶质稀薄、大量吸收空泡形成等病理学变化有所改善,呈现出正常甲状腺滤泡与 GD 甲状腺滤泡共存的特点。这是由于治疗延缓了 GD 病理学进展,还是已发生的 GD 病理学改变因治疗而逆转,尚需进一步研究。

治疗后各组小鼠重要器官均未见明显损伤,证明上述 2 种治疗方法及治疗剂量均安全、可靠。

综上,本研究使用靶向 TSHR 的 siRNA 和 ICAM-1 mAb 分别对 GD 模型小鼠进行实验性治疗,疗效显著,且未见明显的毒性及不良反应。2 种疗法虽各有局限,但具有病因治疗、靶向性强的优势,显示出良好的应用前景,为 GD 靶向治疗拓展了新思路。在今后的研究中,观察长期疗效及远期毒性及不良反应并成功向临床转化,将是研究者面临的挑战。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 郑薇、王萱:研究实施、论文撰写;李宁、刘金剑、王深:实验操作;谭建、贾强、孟召伟:研究指导、经费支持;芮忠颖:实验操作、统计分析

参 考 文 献

- [1] 柴锦燕,方佩华,李宁,等.抗 ICAM-1 单克隆抗体的制备与特性鉴定[J].细胞与分子免疫学杂志,2011,27(11):1212-1214. Chai JY, Fang PH, Li N, et al. Preparation and characterization of ICAM-1 monoclonal antibody [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2011, 27(11): 1212-1214.
- [2] 李宁,方佩华,张艳丽,等.重组人 TSHR 片段蛋白建立人 TRAb ELISA 及临床应用[J].中华核医学杂志,2009,29(5):348-351. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9780.2009.05.016. Li N, Fang PH, Zhang YL, et al. A novel human TSHR antibody ELISA using recombinant extracellular domain fragments of human TSH receptor as antigen and initial clinical evaluation [J]. Chin J Nucl Med, 2009, 29(5): 348-351. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9780.2009.05.016.
- [3] 李宁,冯思源,孙磊,等. TSHR 基因免疫诱导 BALB/c 小鼠 Graves 甲亢伴 Graves 眼病的实验研究[J].中华内分泌代谢杂志,2019,35(5):417-424. DOI:10.3760/cma.j.issn.1000-6699.2019.05.012. Li N, Feng SY, Sun L, et al. An experimental study on the induction of Graves' hyperthyroidism with Graves' ophthalmopathy in BALB/c mice by TSHR gene immunization [J]. Chin J Endocrinol Metab, 2019, 35(5): 417-424. DOI:10.3760/cma.j.issn.1000-6699.2019.05.012.
- [4] 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. DOI:10.3892/mmr.2017.6181.
- [5] 郑薇,谭建,李宁. BALB/c 小鼠格雷夫斯病模型的构建[J].中华核医学与分子影像杂志,2014,34(5):390-395. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2014.05.013. Zheng W, Tan J, Li N. Establishment of BALB/c mice models for Graves disease [J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2014, 34(5): 390-395. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2014.05.013.
- [6] Morshed SA, Davies TF. Graves' disease mechanisms: the role of stimulating, blocking, and cleavage region TSH receptor antibodies [J]. Horm Metab Res, 2015, 47(10): 727-734. DOI:10.1055/s-0035-1559633.
- [7] Liu X, Wang S, Qin L, et al. Short and long-term effects of high-dose intravenous methylprednisolone pulse therapy on thyroid-associated ophthalmopathy [J]. Exp Ther Med, 2016, 12(2): 901-908. DOI:10.3892/etm.2016.3446.

(收稿日期:2020-08-24)