

妊娠期甲状腺功能减退对大鼠子代认知功能的影响

张雅玮^{1,2},程媛媛¹,许敏¹,黄大可³,邓大同¹

摘要 目的 通过实验性甲减妊娠大鼠模型的建立,初步探讨妊娠期甲减和药物干预对大鼠子代认知功能的影响。方法 选取SD雌性大鼠20只随机分为对照组(CON组)和甲减组(PTU组),采用丙硫氧嘧啶(PTU)建立甲减模型,电化学发光免疫法检测雌鼠甲状腺激素水平,比较两组指标差异。造模成功后与雄鼠合笼交配,将甲减组孕鼠再随机分为孕期末干预组(I组)、孕早期干预组(II组)和孕中晚期干预组(III组)。通过莫里斯水迷宫(MWM)实验测试仔鼠学习记忆能力。通过苏木精伊红染色(HE)、尼氏染色及免疫组化观察仔鼠海马神经元的形态结构、成熟神经元核蛋白(NeuN)和突触相关蛋白(SYN)的表达情况。结果 ① PTU组雌鼠较CON组TSH显著增高、FT4显著减低($P < 0.05$)。② 在定位航行试验中,各组仔鼠到达平台的躲避潜伏期均表现逐渐缩短。第5天,I组仔鼠到达平台的潜伏期较CON、II、III组明显延长($P < 0.05$);II、III组与CON组变化不大($P > 0.05$)。③ 空间探索阶段II组仔鼠的滞留时间与I组相比有明显差异($P < 0.05$);I组的仔鼠穿越平台次数与CON、II、III组有明显差异($P < 0.05$)。④ 各组仔鼠海马组织HE染色和尼氏染色无明显差异。但与CON组相比,I、II、III组仔鼠海马组织NeuN、SYN蛋白的平均吸光度值均显著降低($P < 0.05$)。结论 甲状腺功能减退对妊娠大鼠子代认知功能及海马神经元发育会产生不良影响,孕期不同阶段干预对子代认知功能的影响不同,干预越早,对认知功能的损伤越小。

关键词 甲状腺功能减退症;妊娠;子代;海马体;认知功能
中图分类号 R 581.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)06-1035-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.06.019

妊娠期甲状腺功能减退(简称妊娠甲减)是近

2024-03-06 接收

基金项目:2022年度安徽省高校科研计划重点项目(编号:2022AH051141);2020年度安徽城市管理职业学院校级课题自然科学项目(编号:2020zkyb04);2019年安徽医科大学第一附属医院博士科研基金(编号:BSKY2019002)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院内分泌科,合肥 230022

²安徽城市管理职业学院健康养老学院,合肥 230011

³安徽医科大学基础医学院,合肥 230032

作者简介:张雅玮,女,研究生;

邓大同,男,博士,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:13855134251@163.com

年研究^[1]发现影响胎儿智力水平的多发病。甲减可以影响性激素的分泌,导致经量异常、经期延长,甚至闭经不孕^[2]。据报道^[3-4],妊娠期间未经治疗的临床甲减与流产、早产、先兆子痫、妊娠期糖尿病、低出生体重儿、胎死宫内的风险增加有关。胎儿期是中枢神经系统发育的关键时期,胎儿的甲状腺在孕20周前不具有分泌甲状腺激素的能力,该时期是依靠母体甲状腺激素供给维持胎儿正常的脑发育^[1,5],未充分治疗的妊娠期临床甲减患者,其子代神经智力发育也将受到影响^[6]。该研究旨在建立实验性妊娠期甲减孕鼠模型,初步探讨妊娠期甲减对后代认知功能的影响以及孕期不同阶段的干预对临床治疗的重要性。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 SPF级健康SD大鼠雌性(5~6周龄,220±20g)20只,雄性(5~6周龄,220±20g)10只,购自安徽医科大学实验动物中心。温度(24±2)℃,湿度(48±2)%,光暗周期为12h,大鼠自由饮食饮水。将SD雌性大鼠适应性饲养7d后,随机分为对照组(CON组)和甲减组(PTU组),每组10只。实验过程遵循《安徽医科大学实验动物管理和使用指南》,实验操作经安徽医科大学实验动物伦理委员会批准(审批号:LLSC20241432)。剔除实验过程中感染、死亡、未成功受孕以及未成功自然分娩的SD雌性大鼠,最后SD雌性孕鼠计入统计并进行子代大鼠相关实验的共12只,分为对照/孕期末干预/孕早期干预及孕中晚期干预组各3只。各组所产仔鼠随机选择8只。

1.2 主要试剂及仪器 丙硫氧嘧啶片(Propylthiouracil,PTU)(上海朝晖药业有限公司,国药准字:H31021082,50mg/片);左甲状腺素钠片[默克雅柏药业(中国)有限公司,国药准字:J20160065,50μg/片]。T₃、T₄、TSH测定试剂盒及全自动化学发光免疫分析仪(ADVIA Centaur XP)均购自美国西门子医学诊断股份有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 甲减模型制备 参考文献^[6]制备动物模

型,将 PTU 与生理盐水混合溶解成 0.1% 溶液,以每只大鼠 10 ml/kg 灌胃,1 次/d,连续两周进行 PTU 组模型制备,CON 组连续两周灌胃 10 ml/kg 生理盐水。大鼠每日称重并观察生存状态,PTU 组均出现食量下降、毛色黯淡和反应迟钝等表现。两组的 20 只大鼠均分别眶静脉取血 1 ml,高速离心机 3 000 r/min 离心 15 min,分离血清,检测血清甲状腺激素:促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH)、游离四碘甲(状)腺原氨酸(free tetraiodothyronine, FT₄)、游离三碘甲状腺原氨酸(Free triiodothyronine, FT₃)水平,判断甲状腺功能,与 CON 组相比,PTU 组大鼠血清中 TSH 含量上升,伴或不伴 FT₄、FT₃ 含量下降,则为造模成功^[7]。为防止大鼠自我恢复,造模成功后仍采用 PTU 溶液灌胃,维持甲减状态,频率从 1 次/d 改为隔日 1 次。

造模成功后,随机将各组的 2 只雌鼠与 1 只未经处理的 SD 雄鼠合笼交配,自合笼第 2 日清晨起行雌鼠阴道涂片镜检,将发现阴栓的雌鼠取出单独安置,确定为胚胎第 0 天(E0)。模仿人类妊娠周期,将大鼠的妊娠周期分为 3 个阶段:孕早期(孕第 1-7 天),孕中期(孕第 8-14 天),孕晚期(孕第 15 天后)。从造模成功且合笼受孕的雌鼠中随机选取 9 只,分为 3 组,设为孕期末干预组(I)、孕早期干预组(II)、孕中晚期干预组(III),每组 3 只。II 组和 III 组分别在孕第 3 天(E3)和孕第 12 天(E12)时给予左甲状腺素钠片治疗,剂量为 1.25 μg/100 g。干预过程中观察孕鼠生存状态并测定血清甲状腺激素水平,判断甲状腺功能是否恢复正常,并维持正常甲状腺功能水平直至分娩。I 组每日持续灌胃生理盐水,直至分娩。各组产出的仔鼠随机选取 8 只单独安置饲养至 3 周龄。

1.3.2 血清甲状腺激素水平测定 电化学发光免疫分析(electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA)测定雌性大鼠血清中甲状腺激素 TSH、FT₄、FT₃ 含量。

1.3.3 Morris 水迷宫实验(Morris water maze, MWM) 采用 MWM 实验进行空间学习记忆能力测试。在各组中随机抽取 8 只出生后 3 周龄的仔鼠进行 MWM 实验。水池直径 180 cm、高 50 cm、水深 30 cm,水温(22±2)℃。按照东南西北 4 个方向将水池平均划分为 4 个象限,任选其一(本实验选择第 3 象限),正中放置一个顶端平面为 10 cm×10 cm 的平台,高 28 cm,低于水面 2 cm,水池周围参照物保持不变。MWM 实验分为两个部分:①定位航行实

验:实验开始先将小鼠放入水池中(不放平台)自由游泳 1 min 使其熟悉迷宫环境。实验共历时 5 d,每日下午进行一个系列,每一系列包括 4 次。仔鼠面向池壁分别从 4 个不同象限入水,发现平台后在平台上停留 15 s、休息 60 s,再随机由下一象限入水;记录仔鼠发现平台的时间即逃避潜伏期。如果仔鼠入水后 60 s 内找不到平台,则由操作者帮助其上平台,即本实验中的最大逃避潜伏期为 60 s。②空间探索实验:在定位航行实验后第 1 天(本实验第 6 天)撤去平台,将仔鼠从第 1 象限面向池壁放入水中,观察并记录 90 s 内在第 3 象限内滞留时间及穿越原始平台的次数。为排除视觉损害对测试成绩的影响,行可视平台实验,即平台露出水面 1 cm 时,观察仔鼠到达平台的时间。

1.3.4 海马标本制作及观察 仔鼠行为学实验结束后次日,3%戊巴比妥钠(0.1 ml/kg)腹腔注射麻醉,解剖仔鼠,暴露心脏,行左心室穿刺,自心尖部快速滴入生理盐水,同时右心耳开口,一边灌流生理盐水一边挤压肝脏,待右心耳流出液清亮、肝脏变白后继续注入 4%多聚甲醛灌注固定,待四肢抽搐、全身僵硬后固定板上断头取脑,留取新鲜海马和皮质组织,4%多聚甲醛中固定,后经石蜡包埋,切片。

1.3.5 苏木精-伊红(HE)染色 仔鼠脑海马组织石蜡切片经二甲苯脱蜡、复水后,进行苏木精染色,盐酸乙醇返蓝,伊红水溶液染色,再经梯度乙醇脱水,二甲苯透明处理,最后封片。光学显微镜下观察海马神经元形态结构的变化情况并采集图片。

1.3.6 尼氏染色 取仔鼠海马组织切片,常规脱蜡至水,用 1%甲苯胺蓝水溶液进行染色,染色 20 min 后冲洗多余的染色,乙醇分化、脱水,二甲苯透明后中性树脂胶封固。光学显微镜下观察并拍摄图片。

1.3.7 免疫组化染色 免疫组化法检测成熟神经元核蛋白(neuron-specific nucleoproteins, NeuN)和突触相关蛋白(synapse-associated proteins, SYN)的表达。仔鼠海马组织切片常规脱蜡至水,浸入柠檬酸盐修复液 500 ml 微波修复,水浴冷却。滴加 3% H₂O₂ 孵育 20 min, PBS 缓冲液漂洗 3 次后,滴加适当稀释的 NeuN、SYN 一抗,4℃孵育过夜。PBS 漂洗 3 次,分别滴加二者相应抗小鼠/兔二抗。再次 PBS 漂洗 3 次,加入 DAB 显色液。苏木精复染、蓝化,梯度乙醇脱水,二甲苯透明、封片,光学显微镜下采集图片,观察标本切片染色情况,使用图像分析软件分析 NeuN 和 SYN 的平均吸光度值。

1.4 统计学处理 数据分析采用 SPSS 23.0 统计

学软件进行处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 描述,正态分布的计量资料采用两独立样本 t 检验,多组间比较行单因素方差分析,两两比较方差齐用 LSD 检验,方差不齐采用塔姆黑尼检验,不符合正态分布采用非参数秩和检验。重复测量数据采用重复测量方差分析;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组母代大鼠血清甲状腺激素水平比较

与 CON 组比较,PTU 组大鼠血清中 TSH 含量明显增高、 FT_4 含量显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$), FT_3 含量略微降低,见表 1。

表 1 CON 组与 PTU 组雌性大鼠甲状腺功能指标比较
($n = 10, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | FT_3 (pmol/L) | FT_4 (pmol/L) | TSH (mU/L) |
|-----|-----------------|--------------------|------------------------|
| CON | 1.18 ± 0.13 | 38.08 ± 4.68 | 0.002(0.00125 ~ 0.002) |
| PTU | 1.16 ± 0.19 | $14.61 \pm 8.40^*$ | 0.618(0.475 ~ 0.681)* |
| F 值 | 0.02 | 47.60 | 43.625 |

与 CON 组比较: * $P < 0.05$

2.2 各组仔鼠行为学指标

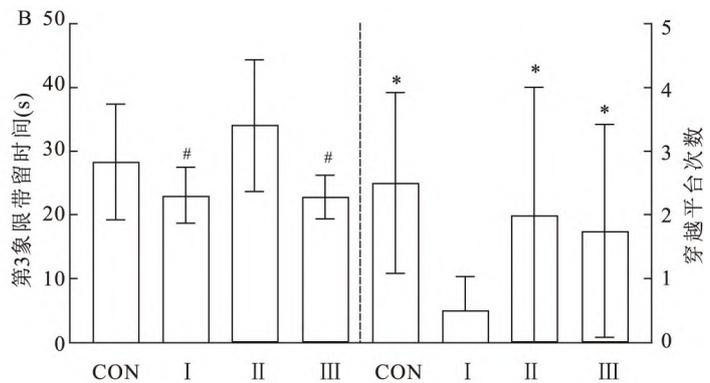
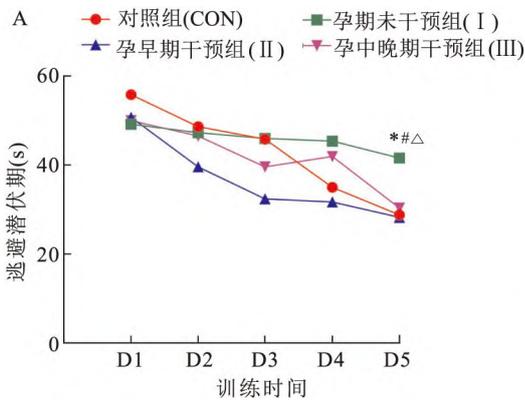


图 1 空间探索实验

A: 定位航行实验逃避潜伏期; B: 空间探索实验各组仔鼠第 3 象限平台滞留时间、穿越平台次数; 与 I 组比较: * $P < 0.05$; 与 II 组比较: # $P < 0.05$; 与 III 组比较: $\Delta P < 0.05$

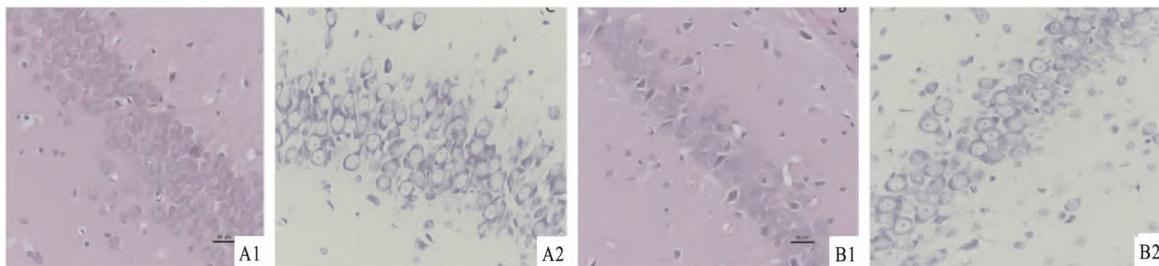


图 2 仔鼠海马组织 CA1 区神经元 HE 染色和尼氏染色结果 $\times 400$

A: CON 组; B: I 组; 1: HE 染色; 2: 尼氏染色

2.2.1 定位航行实验

数据显示,在定位航行测试中,从第 1 天至第 5 天随着训练的进展,各组仔鼠到达平台的逃避潜伏期均表现逐渐缩短。在第 1 天,除 CON 组外,其余各组无明显差异。第 5 天时, I 组仔鼠到达平台的潜伏期与 CON、II、III 组相比均显著延长 ($P < 0.05$); II、III 组仔鼠与 CON 组相比未见明显改变 ($P > 0.05$),见图 1A。

2.2.2 空间探索实验

数据显示,各组仔鼠在第 3 象限滞留时间有明显差异, II 组仔鼠在平台象限的滞留时间与 I 组和 III 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$); I 组仔鼠穿越平台的次数较 CON、II、III 组差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 1B。

2.3 海马组织形态

CON 组与 I 组仔鼠海马组织通过 HE 染色观察到 CA1 区域结构完整,锥体神经元形态规则,呈金字塔形且排列紧密,胞内结构多而清晰,无明显水肿。通过尼氏染色显示 CA1 区域神经元结构完整,核大而圆,胞质深蓝色,胞质内有丰富的尼氏小体,锥体层细胞排列整齐,呈锥体或球星,胞质呈深蓝色,未观察到明显的神经元丢失。见图 2。

2.4 海马组织 NeuN、SYN 表达情况 ① 各组仔鼠海马 NeuN 表达水平:与 CON 组相比, I、II、III 组仔鼠海马组织 CA1 区 NeuN 阳性细胞的平均吸光度值显著降低 ($P < 0.05$),提示 NeuN 蛋白表达降低,见表 2。② 各组仔鼠海马 SYN 表达水平:与 CON 组相比, I、II、III 组仔鼠海马组织 CA1 区 SYN 平均吸光度值显著降低 ($P < 0.05$),提示 SYN 蛋白表达降低,见表 2。

表 2 各组仔鼠海马 NeuN、SYN 蛋白表达的平均吸光度值
($n=8, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | NeuN | SYN |
|-----|--------------|----------------|
| CON | 0.8 ± 0.14 | 0.39 ± 0.07 |
| I | 0.24 ± 0.02* | 0.23 ± 0.01* |
| II | 0.3 ± 0.02* | 0.32 ± 0.02*# |
| III | 0.28 ± 0.02* | 0.26 ± 0.02*#& |
| F 值 | 108.72 | 23.47 |

与 CON 组比较,* $P < 0.05$;与 I 组比较;# $P < 0.05$;与 II 组比较;# $P < 0.05$

3 讨论

近年妊娠期甲状腺功能减退患病率呈增高趋势。既往研究^[8-10]表明,妊娠甲减患者不仅损害母体自身健康,更对子代神经认知功能发育存在负面影响。通过给予左甲状腺素干预可改善妊娠期甲减患者子代神经心理发育情况^[11-12]。本研究也得出相同结论,但本研究对孕期干预的时机进行了分组,发现母体孕期越早干预其子代认知功能损伤程度越小,改善效果越好。分析其原因可能是:① 妊娠早期,胎儿甲状腺尚未发育成熟,其生长发育所需的甲状腺激素完全依赖母体。若孕期母体甲状腺激素分泌减少,则子代合成甲状腺激素的原料供应不足。② 海马体的 CA1 区域是影响神经认知功能的关键脑部位。该区域神经元的成熟度与学习记忆能力显著相关。NeuN 蛋白是神经元成熟的重要标志物,其表达水平与神经元活跃度紧密相关。神经元之间信息的传递、处理及储存等均通过突触进行。SYN 蛋白是影响突触传递的重要物质,其阳性表达减少可以影响突触小泡的运输能力。甲减会抑制室管膜下区域和海马齿状回颗粒下层区域的神经生成^[13],尤其是未成熟神经元的活性会不断受到抑制。甲减还可以破坏连接在神经元之间的突触的可塑性以及神经元的成熟度,从而影响认知功能。本实验中提示孕早期干预较未干预的蛋白表达有显著差异,进一步说明早干预少损伤。③ 经早期左甲状腺素钠片

干预后,可较良好地将孕妇甲状腺功能维持在孕期控制目标内,弥补妊娠期甲状腺激素的不足,保障胎儿阶段神经系统的分化和发育,继而减轻对子代神经智力的损伤。但孕期不同干预阶段的最佳治疗剂量尚不明确,有待进一步研究。本项研究也存在一定的局限性,未来关于妊娠甲减对子代认知功能影响和机制的深入研究,应注意以下几点:首先母体妊娠与甲减疾病状态发生的先后关系可能对后代认知功能有不同影响,可以分别建立甲减大鼠妊娠模型与妊娠大鼠合并甲减模型进一步探讨两者对后代认知的影响。其次可以探索妊娠甲减改变突触可塑性及传递信号通路的机制,再次设置孕期不同阶段不同剂量的药物干预,观察其对子代认知的作用。为了认知更全面评价后代的认知功能,应开展恐惧条件反射测试、避暗测试等多项行为学试验,以及后代远期认知功能的实验。

综上所述,妊娠期甲状腺功能减退可以影响海马神经元的突触可塑性及相关蛋白表达,导致子代认知功能障碍。在孕期的不同阶段干预,子代认知功能障碍的程度及临床表现有明显差异,及时有效地筛查和治疗可以尽量减少甚至避免损伤。我国《妊娠和产后甲状腺疾病诊治指南(第 2 版)》指出妊娠早期临床甲减的孕妇建议 2~4 周检测甲状腺功能,及时调整药量^[14-15]。建议女性在怀孕前进行筛查,密切关注孕期甲状腺并对甲状腺功能的变化进行动态监测,特别是高危孕龄期的女性更要注意。对于确诊的甲减孕妇,要及时进行治疗,减轻对产妇及子代的严重伤害。

参考文献

- [1] 李 侠,王 华. 甲状腺功能减退孕鼠的仔鼠学习记忆能力及海马 Reelin 蛋白表达[J]. 贵州医科大学学报,2017,42(11):1279-82,1286.
- [2] 刘春晓,范建霞. 妊娠合并甲状腺功能减退的妊娠期监测和处理[J]. 实用妇产科杂志,2023,39(5):336-9.
- [3] 姜柏华,陶鑫丽,欧阳振波,等. 中美妊娠期甲状腺疾病诊疗指南的解读[C]. 上海来溪会务服务有限公司. 2021 第五届公共健康与医学科学国际会议论文集. Science Publishing Group, 2021:6.
- [4] Allan W C, Haddow J E, Palomaki G E, et al. Maternal thyroid deficiency and pregnancy complications: implications for population screening[J]. J Med Screen, 2000, 7(3): 127-30.
- [5] Williams G R. Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid hormone[J]. J Neuroendocrinol, 2008, 20(6): 784-94.
- [6] Jansen T A, Korevaar T I M, Mulder T A, et al. Maternal thyroid

- function during pregnancy and child brain morphology: a time window-specific analysis of a prospective cohort[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2019, 7(8): 629–37.
- [7] 刘洲君. 母鼠甲状腺机能减退对子代糖代谢的影响及其机制[D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [8] 王梅, 陈冬云. 芪桂汤对甲减模型大鼠机体神经内分泌与自身免疫及甲状腺激素合成因子影响[J]. *四川中医*, 2019, 37(1): 60–2.
- [9] Moog N K, Entringer S, Heim C, et al. Influence of maternal thyroid hormones during gestation on fetal brain development[J]. *Neuroscience*, 2017, 342: 68–100.
- [10] 郭泽彬, 陈健霞, 徐娟, 等. 促甲状腺激素水平与ICU患者预后的关联[J]. *中华危重病急救医学*, 2022, 34(1): 75–9.
- [11] Anifantaki F, Pervanidou P, Lambrinoudaki I, et al. Maternal prenatal stress, thyroid function and neurodevelopment of the offspring: a mini review of the literature[J]. *Front Neurosci*, 2021, 15: 692446.
- [12] 谭艳丽, 殷焱龙, 陈云贞. 左甲状腺素干预妊娠期亚临床甲状腺功能减退症患者甲状腺功能及子代神经心理发育的短期影响[J]. *临床和实验医学杂志*, 2021, 20(14): 1504–7.
- [13] Kampouri M, Margetaki K, Koutra K, et al. Maternal mild thyroid dysfunction and offspring cognitive and motor development from infancy to childhood: the Rhea mother-child cohort study in crete, greece[J]. *Epidemiol Community Health*, 2021, 75(1): 29–35.
- [14] 陈亚丽, 邱建武, 林小娟, 等. 母亲妊娠期甲状腺功能减退对新生儿的影响[J]. *当代临床医刊*, 2023, 36(2): 14–5.
- [15] 中华医学会内分泌学分会. 妊娠和产后甲状腺疾病诊治指南(第2版)[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2019, 35(8): 635–65.

Effect of hypothyroidism in pregnancy on cognitive function in rat offspring

Zhang Yawei^{1,2}, Cheng Yuanyuan¹, Xu Min¹, Huang Dake³, Deng Datong¹

(¹*Dept of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;*

²*School of Health and Retirement, Anhui City Management Vocational College, Hefei 230011;*

³*Anhui Medical University Basic Medical College, Hefei 230032)*

Abstract Objective To investigate the effects of hypothyroidism and drug intervention on the cognitive function of rat offspring through the establishment of a rat model of experimental hypothyroidism in pregnancy. **Methods** A total of 20 SD female rats were randomly divided into control group (CON group) and hypothyroid group (PTU group). The hypothyroid model was established by propylthiouracil (PTU), the thyroid hormone levels of female mice were detected by electrochemiluminescence immunoassay, and the differences between the two groups were compared. After successful modeling, the male mice were mated in cages, and the hypothyroid group was randomly divided into no intervention group (group I), first trimester intervention group (group II) and second and third trimester intervention group (group III). The Morris water maze (MWM) experiment was used to test the learning and memory ability of the rats. The morphological structure of hippocampal neurons, the expression of nucleoprotein (NeuN) and synapse-associated protein (SYN) in mature neurons were observed by hematoxylin-eosin staining (HE), Nissl staining and immunohistochemistry. **Results** ① Compared with the CON group, the female mice in the PTU group had a significant increase in TSH and a significant decrease in FT4 ($P < 0.05$). ② In the positioning navigation test, the evasion latency of the pups in each group was gradually shortened. On the 5th day, the incubation period of group I was significantly longer than that of groups CON, II, III ($P < 0.05$). There was little change between groups II and III and CON groups ($P > 0.05$). ③ The residence time of group II was significantly different from that in group I during the space exploration stage ($P < 0.05$). There was a significant difference between the number of pups crossing the platform in group I and groups CON, II and III ($P < 0.05$). ④ There was no significant difference between HE staining and Nissl staining in hippocampal tissues of rats in each group. However, compared with the CON group, the average absorbance of NeuN and SYN proteins in the hippocampus of mice in groups I, II and III was significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** Hypothyroidism will have adverse effects on the cognitive function and hippocampal neuron development of pregnant rats, and the effects of intervention on the cognitive function of offspring at different stages of pregnancy are different, the earlier the intervention, the smaller the damage to cognitive function.

Key words hypothyroidism; pregnancy; offspring; hippocampus; cognitive function