



# 基因敲入小鼠甲亢性低钾型周期性麻痹模型的评价

智红叶<sup>1</sup>, 徐宏燕<sup>1</sup>, 陈瑛瑛<sup>2</sup>, 陈亚宁<sup>2</sup>, 周丽君<sup>3</sup>, 战大伟<sup>4</sup>, 颜克松<sup>4</sup>, 姚合斌<sup>1,2\*</sup>

(1. 安徽医科大学海军临床学院, 北京 100048; 2. 中国人民解放军海军总医院 内分泌科, 北京 100048;  
3. 中国人民解放军海军总医院海战伤基础研究中心, 北京 100048;  
4. 中国人民解放军总医院第一附属医院实验动物科, 北京 100048)

**【摘要】** 目的 用基因敲入 CaV1.1-R528H 小鼠建立甲亢性低钾型周期性麻痹模型并对其进行评价。方法 8 周龄基因敲入 CaV1.1-R528H 雄性小鼠及 8 周龄野生型 C57BL/6J 雄性小鼠各 36 只, 采用三因素两水平  $2 \times 2 \times 2$  析因设计方法按体重随机原则(三因素分别为突变、甲状腺素及胰岛素因素, 两水平为有或无)分为 8 组。其中有甲状腺素处理组的小鼠制备高甲状腺素毒症, 按  $350 \mu\text{g}/\text{kg}$  体重连续腹腔注射左旋甲状腺素钠 12 d, 末次给药后有胰岛素处理组按  $0.8 \text{ U}/\text{kg}$  体重给予腹腔注射短效胰岛素, 分别检测并记录各组小鼠注射前(0 min)及注射后(30、60 min)的血钾。结果 (1) 制备高甲状腺素毒症的小鼠出现烦躁不安、易激怒及毛色枯燥现象, 相比如对照组, 饮食及饮水量明显增多, 而体重增加缓慢。甲状腺功能检测显示 T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> 明显高于相比如对照组, TSH 明显低于相比如对照组, 且差异均有显著性( $P < 0.05$ )。(2) 单独给予甲状腺素或胰岛素处理, 突变组与野生组血钾同时间点比较并没有统计学差异, 而在高甲状腺素毒症下给予胰岛素处理后, 突变组与野生组同时间点(30、60 min)比较突变组血钾显著低于野生组( $P < 0.05$ )。(3) 主效应及交互作用: 单独突变因素或甲状腺素因素对血钾并没有作用, 仅有胰岛素对降低血钾有作用( $P < 0.05$ ); 甲状腺素因素和突变因素之间以及胰岛素因素和突变因素之间均有交互作用( $P < 0.05$ ); 甲状腺素因素和胰岛素因素之间没有交互作用。结论 (1) 高甲状腺素毒症制备成功。(2) 利用基因敲入 CaV1.1-R528H 小鼠成功的建立了甲亢性低钾型周期性麻痹模型。

**【关键词】** 甲亢性低钾型周期性麻痹; 基因敲入; CaV1.1-R528H 小鼠; 高甲状腺素毒症; 胰岛素

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)04-0369-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.04.007

## Evaluation of the CaV1.1-R528H gene knock-in mouse model of thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis

ZHI Hong-ye<sup>1</sup>, XU Hong-yan<sup>1</sup>, CHEN Ying-ying<sup>2</sup>, CHEN Ya-ning<sup>2</sup>, ZHOU Li-jun<sup>3</sup>,  
ZHAN Da-wei<sup>4</sup>, YAN Ke-song<sup>4</sup>, YAO He-bin<sup>1,2\*</sup>

(1. Naval Clinical College of Anhui Medical University, Beijing 100048, China; 2. Department of Endocrinology, Navy General Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100048; 3. Center of Naval Battle Wound Basic Medical Sciences, Navy General Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100048; 4. Department of Laboratory Animals, 304 Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100048)

**【Abstract】 Objective** To establish and evaluate the CaV1.1-R528H gene knock-in mouse model of thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis. **Methods** Thirty-six 8-week-old male CaV1.1-R528H gene knock-in mice and thirty-six 8-week-old wild-type male C57BL/6J mice were used in this study. Using three-factor two-level  $2 \times 2 \times 2$  factorial design (the three factors including mutation, thyroxine and insulin, and two levels were with or without), the mice were divided into 8 groups. The thyroxine groups were intraperitoneally injected with levothyroxine in a dose of  $350 \mu\text{g}/\text{kg}$  once per day

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(编号:30671006;81170800);北京市自然科学基金(编号:7154240)。

[作者简介] 智红叶(1983-),女,硕士生,内分泌与代谢病专业。E-mail: hongye111124@126.com

[通讯作者] 姚合斌(1963-),男,博士,硕士生导师,主任医师,研究方向:内分泌与代谢病。E-mail: yhb196321@163.com

for 12 consecutive days to produce thyrotoxicosis. The insulin groups were intraperitoneally injected with short-acting insulin in a dose of 0.8 U/kg after the last administration of levothyroxine, and the potassium levels of different groups were measured and recorded before (0 min) and after insulin injection (30 min, 60 min). **Results** (1) Compared with the control group, the following phenomena including irritability, dull coat, increased diet and water intake, and slow body weight gain, were observed in the thyrotoxic mice. Thyroid function tests showed that the levels of T3 and T4 in the thyrotoxic mice were significantly higher than those in the corresponding control mice ( $P < 0.05$ ), and the TSH level was significantly lower than that of the corresponding control mice ( $P < 0.05$ ). (2) After administration of insulin or thyroxine alone, the potassium levels in the mutant and wild-type mice were not significantly different. However, after combined administration of thyroxine and insulin, the potassium levels in the mutant group were significantly lower than those in the wild-type mice at 30 min and 60 min ( $P < 0.05$  for both). (3) The main effects and interactions: Mutation factor or thyroxine factor alone did not influence on the potassium level, only insulin showed hypokalemic effect ( $P < 0.05$ ). There were interactions between thyroxine and mutation, and between insulin and mutation ( $P < 0.05$ ), but no interaction between thyroxine and insulin. **Conclusions** (1) A thyrotoxicosis state in mice is successfully developed in this study. (2) An CaV1.1-R528H gene knock-in mouse model of thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis is successfully established.

**【Key words】** Thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis; Gene knock-in; CaV1.1-R528H mice; Thyrotoxicosis; Insulin

Corresponding author: YAO He-bin, Email: yhb196321@163.com

甲亢性低钾型周期性麻痹 (thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis, 简称 THPP) 是一种在遗传缺陷基础上, 由于甲状腺素毒症及其他诱因激发的与细胞内外钾离子跨膜转移异常相关的疾病, 主要表现为甲状腺毒症、低钾血症及发作性肌无力<sup>[1]</sup>。该病发病年龄多在 20 ~ 40 岁, 多见于男性, 是我国低钾型周期性麻痹的主要类型。发病前通常伴有明显的诱因, 如高碳水化合物饮食、大量葡萄糖的输入等, 这些诱因均可导致体内胰岛素水平的增多, 诱发该病的发作。目前该病的发病机制仍不是十分清楚, 有研究显示 THPP 存在相关离子通道的突变, 如编码钾通道辅助亚单位、编码钠通道  $\alpha$  亚单位以及内向整流钾通道的突变, 但除个别报道外, 数量极少, 阳性率不足 1%<sup>[2-5]</sup>, 但也说明 THPP 是有离子通道病的特点。因此, 已发现的低钾型周期性麻痹相关突变可以作为甲亢性低钾型周期性麻痹发病机制研究的借鉴与补充, 利用课题组前期构建的钙离子通道缺陷型基因敲入 CaV1.1-R528H 小鼠模型<sup>[6]</sup>进一步建立甲亢性低钾型周期性麻痹模型。目前认为甲亢性低钾型周期性麻痹的发病因素包括本身存在相关离子通道突变、高甲状腺素毒症、导致体内胰岛素增多的诱因以及雄性激素, 因此本实验应用已构建的钙通道缺陷型基因敲入 CaV1.1-R528H 雄性小鼠, 通过给予外源性左旋甲状腺素钠处理来制备小鼠高甲状腺素毒症, 并在高甲状腺素毒症基础上给予注射外源性胰岛素, 模拟人类甲亢性低钾型周期性麻痹发病时的特点, 建立甲亢性低钾型周期性

麻痹动物模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器及试剂

#### 1.1.1 仪器

日本京都干式电解质分析仪 (型号: SE-1520), 购自日本京都有限公司, 采用日本原装配套试剂干片及参比液, 每次实验前使用磁卡对其进行校对; PCR 仪 (型号: 德国 AG22331 Hamburg); DNA 测序仪 (型号: 美国 ABI 公司 Prism 377); 贝克曼 DXC800 全自动生化分析仪, 美国贝克曼库尔特公司; 西门子 Centaur CP 全自动化学发光分析仪, 德国西门子公司; 电子天平 (型号: YP/0001), 购自上海越平科学仪器有限公司; 胰岛素一次性使用无菌注射器, 美国 BD 公司; 一次性注射器 (1、5、20 mL), 购自深圳市保安医疗用品有限公司。

#### 1.1.2 试剂

左旋甲状腺素钠, 阿拉丁 (货号: T113354); T3、T4 及 TSH 测定试剂盒, 西门子医学诊断产品有限公司; 短效胰岛素 (10 mL: 400 U), 购自江苏万邦生化医药股份有限公司; Tap 酶、dNTP, 购自大连宝生物工程有限公司; DNA ladder marker, 购自深圳晶美生物技术有限公司; PCR 引物, 上海英俊生物技术有限公司和上海生物工程有限公司合成; 0.9% 生理盐水, 购自天津天安药业股份有限公司。

### 1.2 实验动物及实验环境

8 周龄 SPF 级野生型 C57BL/6J 雄性小鼠 36

只, 体重为 21 ~ 23 g, 购自北京斯贝福实验动物科技有限公司【SCXK(京)2011-0004】; 8 周龄 SPF 级基因敲入 CaV1.1-R528H 雄性小鼠 36 只, 体重为 21 ~ 23 g, 由本课题组在中国人民解放军总医院第一附属医院(304 医院) 动物实验室传代所得, 原代小鼠由本课题组和上海南方模式生物研究中心共同研制【SCXK(沪)2009-0023】。所有小鼠均饲养于中国人民解放军总医院第一附属医院(304 医院) 屏障环境动物房【SYXK(军)2012-2014】。实验室温度控制在 20 ~ 26℃, 湿度 40% ~ 70%, 每周换两次垫料, 添加食物和水。所有小鼠按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀, 购买的野生型 C57BL/6J 小鼠在适应性饲养一周后开始正式实验。

### 1.3 基因敲入 CaV1.1-R528H 小鼠的鉴定及其生化指标检测

实验所使用的基因敲入 CaV1.1-R528H 小鼠为传代小鼠, 在传代中突变基因是否会发生丢失, 对其进行了鉴定。基因敲入 CaV1.1-R528H 小鼠是以野生型 C57BL/6J 小鼠为背景构建的, 因此选取野生型 C57BL/6J 小鼠作为参考对照小鼠, 该小鼠与突变小鼠生化指标是否存在差异, 对二者的生化指标进行检测并比较。

#### 1.3.1 基因敲入 CaV1.1-R528H 小鼠的鉴定

实验前随机抽取 8 只基因敲入 CaV1.1-R528H 小鼠, 提取鼠尾基因组 DNA 进行 PCR 鉴定, 并在 8 只小鼠基因组 DNA 的 PCR 产物中随机选取 5 只进行 DNA 测序。

#### 1.3.2 基因敲入 CaV1.1-R528H 小鼠与野生型 C57BL/6J 小鼠生化指标比较

实验前取 8 周龄基因敲入 CaV1.1-R528H 小鼠雌雄各 8 只以及 8 周龄野生型 C57BL/6J 小鼠雌雄各 8 只, 所有小鼠于当日 20:00 开始禁食、禁水, 次日早晨 8:00 摘取眼球取血于 EP 管中送检, 检测指标包括葡萄糖(GLU)、丙氨酸氨基转氨酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转氨酶(AST)、肌酸激酶(CK)、血肌酐(Cr)、电解质( $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ ) 8 项指标。

### 1.4 实验设计及实验方法

#### 1.4.1 实验设计

实验采用三因素两水平  $2 \times 2 \times 2$  析因设计方法, 三因素分别为突变、甲状腺素及胰岛素因素, 两个水平为有或无。

#### 1.4.2 动物分组

取 8 周龄基因敲入 CaV1.1-R528H 雄性小鼠及

8 周龄野生型 C57BL/6J 雄性小鼠各 36 只, 采用三因素两水平  $2 \times 2 \times 2$  析因设计方法按体重随机原则分为野生 + 盐水组、突变 + 盐水组、野生 + 盐水 + 胰岛素组、突变 + 盐水 + 胰岛素组、野生 + 甲状腺素 + 盐水组、突变 + 甲状腺素 + 盐水组、野生 + 甲状腺素 + 胰岛素组及突变 + 甲状腺素 + 胰岛素组 8 组, 其中有甲状腺素处理组每组 8 只, 其他组每组 10 只。

#### 1.4.3 高甲状腺素毒症制备及给药方法

有甲状腺素处理组的小鼠每日腹腔注射左旋甲状腺素钠(按 350  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), 左旋甲状腺素钠用生理盐水配制成浓度为 35  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的溶液, 按 0.1 mL/10 g 体重的量腹腔注射, 连续注射 12 d<sup>[7]</sup>。同时其余组小鼠给予 0.9% 生理盐水作为对照, 按 0.1 mL/10 g 体重的量腹腔注射。实验期间观察小鼠外观行为, 测量并记录小鼠体重。最后一次给药后有胰岛素处理组的小鼠给予腹腔注射短效胰岛素(0.8 U/kg), 胰岛素用 0.9% 生理盐水稀释配置成 0.1 U/mL, 按 0.1 mL/10 g 体重的量腹腔注射, 同时其余组以注射相同体积的 0.9% 生理盐水作为对照。

#### 1.4.4 血钾及甲状腺功能测定

小鼠断尾取血, 采取让血液自由滴入的方式, 取血约 25  $\mu\text{L}$  即可, 避免用手挤压鼠尾, 防止红细胞破裂影响血钾, 取血后立即用干式电解质分析仪进行血钾测定, 分别在胰岛素或生理盐水注射前(0 min) 及注射后(30、60 min) 测定并记录血钾。测完血钾后, 野生 + 盐水组、突变 + 盐水组、野生 + 甲状腺素 + 盐水组及突变 + 甲状腺素 + 盐水组小鼠于当日 20:00 开始禁食不禁水 12 h 后, 次日早晨摘取眼球取血于 EP 管并送检实验室, 检测血清 T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> 及 TSH。

### 1.5 统计学处理

所有数据采用 SPSS 16.0 统计软件进行处理, 采用独立样本 *t* 检验、重复测量方差分析以及析因设计重复测量方差分析进行比较<sup>[8-9]</sup>。各组数据均以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 基因敲入 CaV1.1-R528H 小鼠鉴定结果及其生化指标检测结果

#### 2.1.1 基因敲入 CaV1.1-R528H 小鼠鉴定结果

PCR 结果显示 8 只小鼠的基因组 DNA 扩增片段长度为 870 bp, 为纯合子基因敲入 CaV1.1-

R528H 小鼠,而对照的野生型小鼠 DNA 扩增片段长度为 748 bp。DNA 测序结果证实 5 只小鼠为携带 CaV1.1 基因 G→A 突变的小鼠,并与野生型小鼠进行对比。

### 2.1.2 基因敲入 CaV1.1-R528H 小鼠与野生型 C57BL/6J 小鼠生化指标比较结果

基因敲入 CaV1.1-R528H 小鼠与野生型 C57BL/6J 小鼠同性别之间比较,结果差异无显著性 ( $P > 0.05$ );基因敲入 CaV1.1-R528H 小鼠雌、雄之间比较及野生型 C57BL/6J 小鼠雌、雄之间比较,结果差异均无显著性 ( $P > 0.05$ ) (表 1)。

表 1 生化指标比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Tab. 1 Comparison of biochemical indexes in the mice

检测项目 Test items	基因敲入 CaV1.1-R528H 小鼠 CaV1.1-R528H gene knock-in mice		野生型 C57BL/6J 小鼠 Wild-type C57BL/6J mice	
	雌性 Female	雄性 Male	雌性 Female	雄性 Male
	ALT / U/L	40.4 ± 5.9 *	40.0 ± 6.5 * <sup>△</sup>	41.4 ± 6.2
AST / U/L	130.9 ± 17.0 *	131.9 ± 12.0 * <sup>△</sup>	127.3 ± 13.8	126.8 ± 9.9 <sup>△</sup>
CK / U/L	2094.1 ± 491.7 *	2020.6 ± 368.8 * <sup>△△</sup>	2014.9 ± 306.8	2009.8 ± 405.3 <sup>△</sup>
Cr / μmol/L	29.5 ± 5.4 *	29.4 ± 5.7 * <sup>△</sup>	33.9 ± 7.5	34.1 ± 5.4 <sup>△</sup>
GLU / mmol/L	6.6 ± 0.5 *	6.7 ± 0.9 * <sup>△</sup>	6.1 ± 0.4	6.6 ± 0.6 <sup>△</sup>
Na <sup>+</sup> / mmol/L	142.8 ± 5.2 *	141.4 ± 5.9 * <sup>△</sup>	141.1 ± 6.2	144.9 ± 5.8 <sup>△</sup>
K <sup>+</sup> / mmol/L	7.1 ± 0.7 *	6.6 ± 0.8 * <sup>△</sup>	6.9 ± 0.7	6.7 ± 0.6 <sup>△</sup>
Cl <sup>-</sup> / mmol/L	112.6 ± 4.9 *	116.6 ± 8.2 * <sup>△</sup>	116.6 ± 6.7	115.0 ± 7.7 <sup>△</sup>

注:与野生型同性别组比 \* $P > 0.05$ ;与同型雌性组比 <sup>△</sup> $P > 0.05$ 。

Note: \* $P > 0.05$ , compared with the same gender of wild type group; <sup>△</sup> $P > 0.05$ , compared with the female mice of the same type group.

表 2 T3、T4 及 TSH 指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Comparison of the indicators T3, T4 and TSH in the mice

组别 Groups	n	T3 / nmol/L	T4 / nmol/L	TSH / μIU/mL
突变对照组 Mutation-control group	10	1.1 ± 0.3	49.6 ± 21.7	0.19 ± 0.10
野生型对照组 Wild-type control group	10	1.3 ± 0.2	39.9 ± 12.4	0.17 ± 0.07
突变甲状腺素组 Mutation-thyroxine group	8	2.0 ± 0.5 *	194.4 ± 45.0 *	0.03 ± 0.02 *
野生型甲状腺素组 Wild-type thyroxine group	8	2.2 ± 0.5 <sup>△</sup>	192.3 ± 49.4 <sup>△</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>△</sup>

注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ 。

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

## 2.3 突变、甲状腺素及胰岛素因素对血钾的作用

### 2.3.1 血钾的变化 (表 3)

#### (1) 胰岛素对血钾的影响

胰岛素处理后,与基线值(0 min)相比,野生 + 盐水 + 胰岛素组、突变 + 盐水 + 胰岛素组、野生 + 甲状腺素 + 胰岛素组、突变 + 甲状腺素 + 胰岛素组在处理 30 min 或 60 min 血钾均有下降趋势,除野生 + 甲状腺素 + 胰岛素组外其他处理组均有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。盐水处理后,野生小鼠血钾水平有下降趋势,但野生 + 盐水组与突变 + 盐水组之间同

## 2.2 高甲状腺素毒症鉴定结果

实验过程中观察到注射甲状腺素组在注射左旋甲状腺素钠一周后,出现烦躁不安、易激怒及毛色枯燥现象。相比对照组,饮食及饮水量明显增多,而体重增加缓慢。对照组小鼠精神状况、活动情况及毛色光泽均未见明显异常。甲状腺功能 T3、T4 及 TSH 检测结果显示,基因敲入 CaV1.1-R528H 小鼠与野生型 C57BL/6J 小鼠之间差异无显著性,而注射甲状腺素组小鼠 T3、T4 均明显高于相应对照组, TSH 明显低于相应对照组,且差异有显著性 ( $P < 0.05$ ) (表 2)。

(注:与野生型同性别组比 \* $P > 0.05$ ;与同型雌性组比 <sup>△</sup> $P > 0.05$ )

Note: \* $P > 0.05$ , compared with the same gender of wild type group; <sup>△</sup> $P > 0.05$ , compared with the female mice of the same type group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

(注:与突变对照组比 \* $P < 0.05$ ;与野生对照组比 <sup>△</sup> $P < 0.05$ )

Note: \* $P < 0.05$  compared with the mutant control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the wild control group.

时间点相比并无统计学差异;突变 + 甲状腺素 + 盐水组也观察到血钾下降趋势;其他盐水处理组血钾均无明显变化。

#### (2) 突变对血钾的影响

给予盐水处理后,突变 + 盐水组与野生 + 盐水组两组之间血钾同时间点比较并没有统计学上差异;给予胰岛素处理后,即突变 + 盐水 + 胰岛素组与野生 + 盐水 + 胰岛素组两组之间血钾同时间点比较也并没有统计学上差异;给予甲状腺素处理制备成高甲状腺素毒症后,即突变 + 甲状腺素 + 盐水组与

野生 + 甲状腺素 + 盐水组两组之间血钾同时间点比较也并没有统计学上差异;但在高甲状腺素毒症下给予胰岛素处理后,即高甲状腺素与高胰岛素联合作用下,突变 + 甲状腺素 + 胰岛素组与野生 + 甲状腺素 + 胰岛素组相比突变组血钾在 30 min 或 60 min 时显著低于野生组,差异有显著性( $P < 0.05$ )。

### 2.3.2 主效应及交互作用

表 3 不同处理组小鼠血钾变化情况 ( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)

Tab.3 Changes of the blood potassium levels in different groups of the mice

组别 Groups	n	0 min	30 min	60 min	边际均值 Marginal mean value
野生 + 盐水组 Wild type + saline group	10	7.9 ± 0.7	7.3 ± 0.6*	7.1 ± 0.4*	7.4
突变 + 盐水组 Mutation + saline group	10	7.8 ± 0.7	7.6 ± 1.0	7.6 ± 1.0	7.7
野生 + 盐水 + 胰岛素组 Wild type + saline + insulin group	10	7.7 ± 0.9	6.7 ± 0.5*	6.2 ± 0.6*	6.9
突变 + 盐水 + 胰岛素组 Mutation + saline + insulin group	10	8.0 ± 0.6	6.4 ± 0.7*	6.1 ± 0.5*	6.8
野生 + 甲状腺素 + 盐水组 Wild type + thyroxine + saline group	8	7.5 ± 0.7	7.3 ± 0.6	7.4 ± 0.5	7.4
突变 + 甲状腺素 + 盐水组 Mutation + thyroxine + saline group	8	7.5 ± 0.7	7.3 ± 0.6*	7.4 ± 0.4	7.4
野生 + 甲状腺素 + 胰岛素组 Wild type + thyroxine + insulin group	8	7.6 ± 1.0	7.3 ± 0.9	7.1 ± 0.6	7.3
突变 + 甲状腺素 + 胰岛素组 Mutation + thyroxine + insulin group	8	7.5 ± 1.0	6.2 ± 0.4* <sup>△</sup>	5.9 ± 0.6* <sup>△</sup>	6.5

注:与基线值(0 min)比 \* $P < 0.05$ ;与野生相同处理组比<sup>△</sup> $P < 0.05$ 。

Note. \* $P < 0.05$ , compared with the baseline value; <sup>△</sup> $P < 0.05$ , compared with the same treatment group of wild type mice.

## 3 讨论

甲亢性低钾型周期性麻痹是我国低钾型周期性麻痹的主要发病类型,但目前我国对于 THPP 研究甚少,鉴于人体试验伦理原则的限制,建立甲亢性低钾型周期性麻痹动物模型用来研究 THPP 致病过程及发病机制显得尤为重要,因此利用前期课题组构建的基因敲入 CaV1.1-R528H 小鼠进一步建立了甲亢性低钾型周期性麻痹动物模型。

实验中使用的基因敲入 CaV1.1-R528H 小鼠为传代小鼠,传代小鼠是否还携带突变基因,对其进行了鉴定,结果证实该突变基因在传代中不会发生丢失,能够稳定的遗传到子代小鼠中。实验前对基因敲入 CaV1.1-R528H 小鼠与野生型 C57BL/6J 小鼠的生化指标进行了比较,结果显示它们之间生化指标并无差异,可以用 C57BL/6J 小鼠作为本实验的参考对照。本实验需要多次取血,每次取血后需小鼠存活且状态良好,而眼球和心脏取血容易使小鼠致死,因此只能通过鼠尾取血,而鼠尾取血量少,用

析因设计重复测量方差分析结果显示,单独突变因素或甲状腺素因素对血钾并没有作用,仅有胰岛素对降低血钾有影响,且差异有显著性( $P < 0.05$ );甲状腺素和突变因素之间以及胰岛素和突变因素之间均有交互作用,差异有显著性( $P < 0.05$ ),比较边际均值提示有协同作用;甲状腺素和胰岛素之间无交互作用。

传统湿化学法测定其电解质不易实现。选取干化学法测定电解质,需血量少(约 25  $\mu$ L),可以满足该实验需求。实验前课题组设计了相关实验,对干化学法可以替代湿化学法测定小鼠血电解质进行了验证<sup>[10]</sup>。

甲亢性低钾型周期性麻痹的发病特点是在本身遗传缺陷基础上由于高甲状腺素毒症和其他诱因如胰岛素增多的联合作用下,导致了疾病的发作。目前发现 THPP 存在钾离子通道相关的突变,虽然并未发现钙离子通道存在突变,但该病确实有离子通道疾病的特点,因此利用前期课题组构建的基因敲入 CaV1.1-R528H 小鼠,模拟人类甲亢性周期性麻痹发病特点,建立甲亢性低钾型周期性麻痹动物模型。首先,通过连续给予小鼠注射外源性左旋甲状腺素钠模拟人类高甲状腺素毒症,小鼠在注射左旋甲状腺素钠一周后,出现烦躁不安、易激怒及毛色枯燥现象,以及相比对照组体重增加缓慢,饮食及饮水量明显增多。T3、T4 及 TSH 检测结果显示,注射甲状腺素组小鼠 T3、T4 均明显高于相应对照组,

TSH 明显低于相应对照组,成功的制备了小鼠高甲状腺素毒症。然后,在小鼠高甲状腺素毒症下给予胰岛素处理,以生理盐水作为对照,给予盐水处理后,突变组和野生组小鼠之间血钾同时间点比较并没有统计学上差异,给予单独胰岛素或高甲状腺素毒症处理后,两组小鼠之间血钾同时间点比较也并没有统计学差异,但在小鼠高甲状腺素毒症下,再联合给予胰岛素处理时,两组血钾在同时间点(30、60 min)相比突变组显著低于野生组,说明小鼠突变因素在高甲状腺素毒症和高胰岛素血症联合作用下对血钾有影响。且突变组小鼠血钾相比基线值(0 min)在 30 min 或 60 min 均明显下降,60 min 时下降更明显,下降幅度约为 20%。人类正常平均血钾为 4.2 mmol/L,当血钾低于 3.5 mmol/L 时,即血钾下降幅度约为 17% 时为低钾血症,与人类参考指标相比小鼠血钾下降的幅度达到了低钾血症<sup>[11]</sup>。实验结果也显示突变和甲状腺素因素之间以及突变和胰岛素因素之间具有交互作用,即它们相互联合在一起时对血钾有影响,但突变因素或甲状腺素因素单独对血钾并没有作用,与人类甲亢性低钾型周期性麻痹的发病特点相符,说明运用基因敲入 CaV1.1-R528H 小鼠成功的建立了甲亢性低钾型周期性麻痹模型。

综上所述,本研究首次运用基因敲入 CaV1.1-R528H 小鼠成功的建立了甲亢性低钾型周期性麻痹的动物模型,且首次在整体动物水平下诱发小鼠出现血钾水平降低。以往对低钾型周期性麻痹小鼠模型的研究中,多数是建立在细胞或组织水平,并且是在外源低钾环境中观察模型小鼠肌肉电生理特征变化,并没有诱导出现自发性血钾水平降低。但在本次实验研究中,野生型小鼠和高甲状腺素毒症突变小鼠在注射生理盐水时,也有血钾的下降,考虑可能与小鼠断尾取血时应激产生的高肾上腺素有关,有待以后进一步给予麻醉处理后再进行实验。并且

由于疾病特点以及实验小鼠数量有限,我们仅观察到小鼠低钾血症的表现,并未观察到甲亢性低钾型周期性麻痹其他典型表现,如四肢瘫痪,有待以后进一步实验观察。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Vijayakumar A, Ashwath G, Thimmappa D. Thyrotoxic periodic paralysis: clinical challenges [ J ]. J Thyroid Res, 2014, 2014: 649502.
- [ 2 ] Dias Da Silva MR, Cerutti JM, Arnaldi LA, et al. A mutation in the KCNE3 potassium channel gene is associated with susceptibility to thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis [ J ]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(11): 4881 - 4884.
- [ 3 ] Silva MR, Chiamolera MI, Kasamtsu TS, et al. Thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis, an endocrine emergency: clinical and genetic features in 25 patients [ J ]. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2004, 48(1): 196 - 215.
- [ 4 ] Wang XY, Ren BW, Yong ZH, et al. Mutation analysis of CACNA1S and SCN4A in patients with hypokalemic periodic paralysis [ J ]. Mol Med Rep, 2015, 12(4): 6267 - 6274.
- [ 5 ] Ryan DP, da Silva MR, Soong TW, et al. Mutations in potassium channel Kir2.6 cause susceptibility to thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis [ J ]. Cell, 2010, 140(1): 88 - 98.
- [ 6 ] 雍曾花,徐宏燕,姚合斌,等.低钾型周期性麻痹相关的 Cehl1a3 基因 R528H 敲入小鼠模型的构建 [ J ]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(7): 7 - 13.
- [ 7 ] 李欣,陈长勋,郭娟.知母总皂苷对甲亢模型小鼠影响的实验研究 [ J ]. 中华中医药学刊, 2012, 30(7): 1581 - 1583.
- [ 8 ] 柳伟伟,贺佳陈,舜杰.析因设计重复测量资料的统计分析 & SAS 程序实例 [ J ]. 中国卫生统计, 2007, 24(2): 146 - 148.
- [ 9 ] 李新,范颖.析因设计重复测量资料的统计分析 & SPSS 实现 [ J ]. 数理医药学杂志. 2013, 26(4): 400 - 402.
- [ 10 ] 徐宏燕,智红叶,陈瑛瑛,等.干化学法测定小鼠尾血电解质的可行性研究 [ J ]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(6): 1485 - 1489.
- [ 11 ] Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology [ M ]. Beijing: Peking University Medical Press, 2007: 294.

[ 收稿日期 ] 2016-04-15