

·基础研究·

检测脑脊液游离四碘甲状腺原氨酸预测孕期甲状腺功能减退诱导的子代大鼠自闭样行为

李莉芳¹, 张家祺¹, 杨俊华¹, 马宇昕¹, 李国营^{1,2}

(1. 广东药科大学基础医学院人体解剖学与组织胚胎学系, 广东广州 510006; 2. 广东省医学会, 广东广州 510180)

摘要:【目的】探究脑脊液中甲状腺激素在预测孕期甲状腺功能减退所诱导大鼠自闭样行为的潜在价值。【方法】将12只Wistar孕鼠随机分为对照组、甲状腺功能减退组(甲减模型组), 两组子代鼠于出生后第2天(P2)、P7、P14、P21检测血清和脑脊液中促甲状腺激素(TSH)和总三碘甲状腺原氨酸(TT3)、总四碘甲状腺原氨酸(TT4)、游离三碘甲状腺原氨酸(FT3)、游离四碘甲状腺原氨酸(FT4)水平, 并在P2、P7、P14进行超声波发声测试, P21进行三箱社交试验的行为学试验。【结果】与对照组相比, 在发育期(P0-P21)甲减组的脑脊液中FT4水平显著降低(P2: $P < 0.05$; P7: $P < 0.05$; P14: $P < 0.01$; P21: $P < 0.01$), 仅P0时两组无统计学差异($P > 0.05$)。在超声波发声(USV)试验中, 甲减组子代鼠于P2、P7、P14日龄的USV数量及持续时间均显著低于对照组: USV数量(P2: $P < 0.05$; P7: $P < 0.001$; P14: $P < 0.01$), USV持续时间(P2: $P < 0.05$; P7: $P < 0.001$; P14: $P < 0.001$)。在三箱社交试验中, 甲减组子代鼠在P21相较于对照组与陌生大鼠的嗅探时间显著减少(P 均 < 0.001), 脑脊液FT4水平与USVs数量(P7: $r = 0.883$, $P < 0.05$; P14: $r = 0.902$, $P < 0.05$)及嗅探陌生鼠的时间($r = 0.814$, $P < 0.01$)呈现显著正相关。【结论】检测脑脊液游离FT4能够预测孕期甲减诱导的子代大鼠自闭样行为。

关键词: 甲状腺功能减退; 自闭症; 脑脊液; 游离甲状腺素; 预测指标

中图分类号: R749

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2025)06-1029-12

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2025.0613

Detection of Free T4 in Cerebrospinal Fluid Predicts Autism-like Behaviors in Offspring Rats Induced by Hypothyroidism during Pregnancy

LI Lifang¹, ZHANG Jiaqi¹, YANG Junhua¹, MA Yuxin¹, LI Guoying^{1,2}

(1. Department of Human Anatomy, Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Guangdong Medical Association, Guangzhou 510180, China)

Correspondence to: LI Guoying; E-mail: gzlgying820@163.com

Abstract: 【Objective】 To investigate the potential value of thyroid hormones in cerebrospinal fluid in predicting autism-like behaviors induced by hypothyroidism in pregnant rats. 【Methods】 Twelve pregnant Wistar rats were randomly divided into a control group and a hypothyroidism group (hypothyroidism model group). Offspring from both groups had serum and cerebrospinal fluid levels of thyroid-stimulating hormone (TSH), total triiodothyronine (TT3), total thyroxine (TT4), free triiodothyronine (FT3), and free thyroxine (FT4) levels in serum and cerebrospinal fluid. Ultrasonic vocalization tests were conducted on postnatal day 2 (P2), day 7 (P7), and day 14 (P14), while behavioral tests using the three-box social interaction test were performed on day 21 (P21). 【Results】 Compared with the control group, free T4 (FT4) levels in the cerebrospinal fluid of the hypothyroidism group were significantly reduced during the developmental

收稿日期: 2025-08-01

录用日期: 2025-11-06

基金项目: 广东药科大学重点学科人才配套经费项目(51355093)

作者简介: 李莉芳, 第一作者, 研究方向: 孕期甲减与自闭症相关研究, E-mail: 2651648141@qq.com; 李国营, 通信作者, 教授, 硕士生导师, E-mail: gzlgying820@163.com

period (P0–P21; P2: $P<0.05$; P7: $P<0.05$; P14: $P<0.01$; P21: $P<0.01$), with no statistical difference between the two groups only at P0 ($P>0.05$). In the ultrasonic vocalization (USV) tests, the number and duration of USVs in offsprings from the hypothyroidism group were significantly reduced compared with those of the control group on P2, P7 and P14: for USV counts (P2: $P<0.05$; P7: $P<0.001$; P14: $P<0.01$); for USV duration (P2: $P<0.05$; P7: $P<0.001$; P14: $P<0.001$). In the three-box social tests, offsprings of the hypothyroidism group showed significantly reduced sniffing time with unfamiliar rats at P21 compared to the control group (all $P<0.001$). The FT4 levels in cerebrospinal fluid had a significantly positive correlation with USV counts (P7: $r=0.883$, $P<0.05$; P14: $r=0.902$, $P<0.05$) and sniffing time with unfamiliar rats ($r=0.814$, $P<0.01$). **【Conclusion】** Measuring free T4 in cerebrospinal fluid can predict autism-like behaviors in offsprings of rats induced by hypothyroidism during pregnancy.

Key words: hypothyroidism; autism; cerebrospinal fluid; free thyroxine; predictive indicator

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2025, 46(6): 1029–1040]

自闭症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD) 是一种以社交沟通缺陷及重复刻板行为为特征的神经发育障碍, 男性发病率显著高于女性^[1-2]。越来越多证据表明, ASD 是基因与环境之间复杂相互作用的结果^[3]。其中甲状腺功能减退已被证实与 ASD 风险相关^[2]。在过去的 20 年里, ASD 患病率逐渐增加, 但临床仍缺乏明确的诊断标志物和针对性药物^[4]。

研究发现自闭症的早期干预非常重要, 可以显著改善自闭症儿童的认知能力、语言能力和社交技能, 减少行为问题, 为儿童的长期发展奠定良好基础^[5-6]。以往判定自闭症的指标包括行为观察、神经生物学检测及基因分析, 存在主观滞后、特异性不足、遗传异质性等局限, 难以满足早期干预需求^[7-8]。早期干预的前提是能够在发病前进行有效的预测, 然而目前尚缺乏有效的预测手段。

甲状腺激素在大脑发育中发挥多效性作用, 已有研究证实其可调节细胞生成与存活、细胞分化、迁移、生长及收缩, 参与突触发生、髓鞘形成及神经元回路建立等关键过程^[9]。甲状腺激素通过甲状腺激素 α 受体/甲状腺激素 β 受体 (thyroid hormone receptor α /thyroid hormone receptor β , TR α /TR β) 调控神经前体细胞分化、突触形成及 γ -氨基丁酸能神经元网络建立, 是神经元发育的核心调控因子; 还可调节海马突触可塑性, 影响学习记忆过程^[10-11]。其中在胶质细胞层面, 甲状腺激素能影响星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞等不同神经胶质细胞亚型的分化与成熟, 其中可通过 TR 介导的转录作用调控少突胶质细胞分化及髓磷脂产生, 且除活性形式 T3 外, T4 对星形胶质细胞的作

用也被证实, 提示其还可能通过非基因组途径影响星形胶质细胞功能^[12]。此外, 甲状腺功能异常与精神健康及神经发育密切相关, 不仅可通过干扰海马代谢、神经炎症及神经元活动诱发认知障碍与情绪异常, 孕期甲状腺激素缺乏还会提升后代发生神经发育障碍的风险^[13]。

脑脊液与血清参与脑组织的物质代谢和组织液引流^[14-15]。脑脊液内的成分与神经细胞的活动和病变存在密切的关联^[16]。在帕金森病 (Parkinson's disease, PD)、阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 等神经退行性疾病中被证实与脑脊液或血清中的甲状腺激素水平改变相关^[17-19]。因此我们推测脑脊液或血清中的甲状腺激素水平对脑发育阶段的神经疾病可能有预测价值。该研究成果有望为开发 ASD 早期预警的新生物标志物提供有价值的实验依据。

在本研究中, 我们采用孕期甲减诱发自闭样表型的大鼠模型来评估脑脊液和血清的甲状腺激素水平改变以及这种改变和自闭症样行为的相关度, 从而评估脑脊液和血清中的甲状腺激素水平对自闭症发病的预测价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本研究采用 SPF 级 8 周龄左右的 Wistar 大鼠 (雌性 250 g 左右, 雄性 300 g 左右, 雌雄比例 2:1) 均购自广东省医学实验动物中心 (广东佛山)。实验动物使用许可证号: SCXK (粤) 2022-0002。实验动物饲养在无特定病原体 (SPF) 级标准环境中, 实行

12 h明/暗循环光照制度,并提供充足的食物和水。环境温度控制在22~24℃,相对湿度维持在40%~60%。实验前所有大鼠均进行7 d适应性饲养,以减少环境应激对实验结果的影响,动物饲养与管理参照文献所述^[20]。

于实验当天上午8:00,按每笼一雄两雌的比例进行合笼,次日同一时间将雌鼠和雄鼠分笼并通过阴道栓检查判断雌鼠的孕状态。一旦发现阴道栓即认定该雌鼠处于孕状态,并将分笼当天记为受孕日(gestation day, GD0)。此外,结合体质量动态变化及腹部形态学特征辅助确认受孕。

分娩后子代鼠接受自然哺乳。每日观察确认所有母鼠均存在正常哺乳行为,即子代鼠伏于母鼠腹下的时间占比均超过每天7 h(30%);在生后早期,每日经体表(此时皮肤尚透明)观察子代鼠胃部乳汁充盈状态,以评估是否存在组间差异。另有一批模型组及对照组子代鼠在生后4日龄切取胃部(含内容物)进行称重,以评估乳汁摄入量是否存在组间差异。

本研究已通过广东药科大学实验动物伦理委员会审查批准(伦理批准号:gd pulacSPF2022716),所有操作均遵循动物实验伦理规范,保障实验动物福利。

1.2 主要仪器和试剂

甲硫咪唑(M8506, Sigma-Aldrich),大鼠促甲状腺激素(thyroid-stimulating hormone, TSH)酶联免疫吸附测定试剂盒(ML059371,上海酶联生物公司),大鼠总三碘甲状腺原氨酸(total triiodothyronine, TT3)酶联免疫吸附试剂盒(JL12797,江莱生物公司),大鼠总甲状腺素(total thyroxine, TT4)酶联免疫吸附测定试剂盒(ML059551,上海酶联生物公司),大鼠游离三碘甲状腺原氨酸(free triiodothyronine, FT3)酶联免疫吸附试剂盒(FSEA2126,上海复申生物公司),大鼠游离甲状腺素(free thyroxine, FT4)酶联免疫吸附测定试剂盒(ML002849,上海酶联生物公司),酶标仪(美国伯乐生命医学产品有限公司),冷冻离心机(3H16RI,湖南赫西仪器有限公司)、超声麦克风(Avisoft Bioacoustics,德国柏林)、Topscan™ 2.0系统(CleverSys公司)

1.3 造模与分组

甲状腺功能减退模型制备严格参照文献^[21]所述方法,即自受孕第9天(GD9),通过在孕鼠饮水水中添加0.02% (w/v) (即0.2 g/L)的甲硫咪唑

(methimazole, MMI)至哺乳期结束,以抑制甲状腺激素合成,诱导母体孕期甲状腺功能减退。对照组孕鼠给予常规饮用水,自由摄食饮水。其中MMI能够在孕期间穿过胎盘进入胚胎体内,也可通过乳汁被子代鼠摄入^[22-24]。

本研究实验分为对照组和甲状腺功能减退组(甲减组)。子代样本选择中,实验组与对照组采用一致的选取标准。其中,从出生当天(postnatal day 0, P0)~出生第14天(postnatal day 14, P14)阶段均选取6窝子代鼠,实验组从3窝中各取1只雌性子代鼠、另外3窝中各取1只雄性子代鼠(雌雄各6只,性别均衡),对照组选取方式相同;P21日龄阶段,两组均选取6窝子代鼠,且每窝各取1只雌性和1只雄性子代鼠(雌雄各6只)。

1.4 酶联免疫吸附检测

1.4.1 造模效应评估 分娩当天,采集甲减组与对照组母鼠及子代鼠的躯干血用于甲状腺激素测定。将收集到的血样在室温下静置2 h,然后1 000 × g离心20 min,取上清置于-80℃保存。检测时,分别采用TSH ELISA试剂盒(ML059371,上海酶联生物公司)、TT3 ELISA试剂盒(JL12797,江莱生物)及TT4 ELISA试剂盒(ML059371,上海酶联生物公司)检测TSH、TT3及TT4浓度。检测完成后,使用酶标仪(iMark, USA)在450 nm波长下测定各样本的吸光度(OD值),并根据标准曲线计算相应激素浓度。

1.4.2 子代鼠脑脊液及血清的甲状腺激素水平测定 采集P0~P21子代鼠的躯干血和脑脊液进行甲状腺激素水平的测定。检测采用TSH ELISA试剂盒、TT3 ELISA试剂盒、TT4 ELISA试剂盒、FT3 ELISA试剂盒(FSEA2126,复申生物)、游离甲状腺素(free thyroxine, FT4)ELISA试剂盒(ML002849,上海酶联生物公司)。根据制造商说明书测定甲状腺激素,使用酶标仪(iMark, USA)在450 nm波长下测定各样本的吸光度(OD值),并根据标准曲线计算相应激素浓度。

1.5 妊娠结局评估

在GD10(即造模的第2日)、GD13、GD16、GD19,对造模组孕鼠与对照组孕鼠的体质量进行持续监测,并记录了体质量数据,分娩时观察是否有死胎及子代畸形情况,若有进行记录。同时,测量每窝子代鼠P0~P21的体质量,评估子代生长发育指标。

1.6 行为学测试

1.6.1 超声发声试验 将子代鼠单独从巢穴中取出,置于黑色有机玻璃测试箱(30 cm×30 cm)内,测试箱放置于隔音且温控的舱室中;箱上方架设摄像机以监测子代鼠活动,同时固定一只对10~200 kHz频率敏感的超声麦克风,麦克风距箱底15 cm,用于采集超声发声(ultrasonic vocalizations, USVs)信号。对子代鼠进行3 min USVs检测并采用Avisoft Recorder 5.1软件对USVs进行定量和定性分析,测试时间为P2、P7、P14。

1.6.2 三箱社交试验 三箱社交试验(three-chamber test, TCT)采用Topscan™ 2.0系统。实验前用75%乙醇擦拭仪器去味,P21子代鼠在测试室适应30 min。先将受试子代鼠放中央室适应5 min,一侧为新同种鼠(Stranger 1),另一侧为空笼。移除隔板后,子代鼠自由探索10 min,系统以头部朝向同种鼠且距2 cm内,7帧中至少6帧符合为嗅探事件,8帧移出则结束,以此区分嗅探与其他行为。随后10 min引入Stranger 2至空笼,通过系统分析和摄像机高分辨率记录,评估子代鼠嗅探行为及社交兴趣。

1.6.3 大理石埋藏试验 在标准笼具内铺设5 cm厚清洁垫料,放置20颗直径10 mm玻璃珠,让子代鼠在昏暗的照明下探索10 min,10 min结束后将动物轻轻地从测试笼中取出,并记录埋藏的弹珠数量,以珠子被覆盖≥50%为有效埋藏,评估重复刻板行为,测试时间为子代鼠出生后21 d。

1.6.4 旷场试验 将子代鼠置于40 cm×40 cm×40 cm旷场中央,通过TopScan™ 2.0系统划分中心区(内侧25%)与周围区,记录5 min内的中心区停留时间及进入次数,以四肢完全进入计为1次,检测焦虑样行为,测试时间为子代鼠出生后21 d。

1.7 统计学方法

数据分析使用SPSS 27.0软件进行。统计数据均以均值±标准差(Mean ± SD)形式呈现。根据不同的检测指标,选择使用Student's *t*检验,设定显著性水准为 $\alpha=0.05$ 。所有数据均采用Shapiro-Wilk检验评估正态性,显著性水准设定为 $\alpha=0.1$,结果表明所有数据集均符合正态分布($P>0.1$)。采用Levene's检验评估方差齐性,显著性水准设定为 $\alpha=0.1$,其中只有表3中母鼠Serum TT4水平的数据不满足组间方差齐性($P<0.1$),因此采用非参数检验(Wilcoxon秩和检验)。相关性分析的方法为Pearson相关性分析。所有统计推断均设定显著性水准为 $\alpha=0.05$ 。在统计推断中 $P<0.05$ 认为组间差异或相关性具有统计学意义。使用GraphPad Prism 9.5软件进行统计学绘图。

2 结果

2.1 孕期甲减对母鼠孕期体质量及子代鼠体质量的影响

从GD9到哺乳期结束,给予Wistar大鼠含0.02%(w/v)MMI的饮用水来诱导甲状腺功能减退,以评估其对母鼠孕期的体质量。经统计分析表明,从GD16开始到分娩前,甲减组母鼠的体质量明显低于对照组母鼠的体质量(表1)。同时通过观察孕鼠分娩情况发现甲减组与对照组均没有流产、死胎现象,出生当天子代鼠外观正常,未见畸形。

通过记录在P0、P2、P7、P14、P21甲减组与对照组的子代鼠体质量变化情况。结果表明,与对照组相比,甲减组子代鼠出生后体质量增加幅度显著下降(表2)。

表1 对照组和甲减组母鼠孕期体质量的比较

Table 1 Comparison of body weight during pregnancy between the control group and the hypothyroidism group

Groups	<i>n</i>	Sex	GD10 weight /g	GD13 weight /g	GD16 weight /g	GD19 weight /g
Control	6	6♀	283.32±3.20	305.15±2.92	329.03±2.66	361.34±3.69
MMI	6	6♀	282.13±2.51	302.87±4.10	325.11±3.03*	355.21±4.20*
<i>t</i>			0.715	1.108	2.386	2.688
<i>P</i>			0.491	0.294	0.038	0.023

MMI: methimazole; GD: gestational day 10; GD13: gestational day 13; GD16: gestational day 16; GD19: gestational day 19; Data are expressed as Mean ± SD. Student's *t*-test, *n*=6 per group, * $P<0.05$ vs. control. ♀:female.

表2 对照组和甲减组子代鼠体质量的比较

Table 2 Comparison of body weight between the control group and the hypothyroidism group offspring rats

Groups	n	Sex	P0 weight /g	P2 weight /g	P7 weight /g	P14 weight /g	P21 weight /g
Control	6	6♀	4.66±0.085	8.26±0.47	20.36±1.37	32.76±2.35	56.09±2.91
MMI	6	6♀	4.51±0.10*	7.59±0.40*	17.28±1.23**	27.97±2.78**	51.12±2.14**
t			2.788	2.639	3.955	3.223	3.364
P			0.019	0.025	0.003	0.009	0.007
Control	6	6♂	5.04±0.090	9.18±0.29	21.59±1.77	33.06±2.19	58.05±2.88
MMI	6	6♂	4.90±0.010*	8.84±0.20*	18.70±1.26**	28.99±2.14**	53.09±2.48**
t			2.649	2.380	3.242	3.251	3.202
P			0.024	0.039	0.009	0.009	0.009

MMI: methimazole; P0: postnatal day 0; P2: postnatal day 2; P7: postnatal day 7; P14: postnatal day 14; P21: postnatal day 21; Data are expressed as Mean ±SD. Student's *t*-test, *n*=6 per group, **P*<0.05, ***P*<0.01 vs. control. ♀:female; ♂: male.

此外,模型鼠(与对照组)子代鼠出生后4日龄胃(含内容物)总重量不具有显著的组间差异[对照组:(143.87±10.95) mg;甲减组:(138.55±12.73) mg;*t*=0.776;*P*=0.456;*n*=6]。关于对检测时间的选择,我们考虑到出生后子代在适应性环境过程中未建立成熟的哺乳习惯以及在较大日龄存在饮水和摄入饲料的行为,选择在出生后第4天进行检测。

2.2 甲减组的造模效应评估结果

检测 Wistar 大鼠分娩当天母鼠及子代鼠的血清中TSH、TT3、TT4水平。结果显示,与对照组母鼠相比,甲减组母鼠的TSH水平显著升高,而TT3、TT4水平均明显降低。与对照组子代鼠相比较,甲减组子代鼠的TSH水平明显升高,且TT3、TT4水平均明显降低,提示 MMI 诱导的甲状腺功能减退模型成功建立(表3)。

表3 母鼠及子代鼠在分娩当天血清中的 TSH、TT3、TT4 水平

Table 3 Levels of TSH, TT3 and TT4 in the serum of dams and pups on the day of delivery

Items	Groups	n	Sex	Serum TSH /(μ U/mL)	Serum TT3 /(ng/dL)	Serum TT4 /(ng/mL)
Dam	Control	6	3♂/3♀	2.80±0.33	53.03±5.64	18.04±1.93
	MMI	6	3♂/3♀	12.20±1.06***	40.9±10.01*	5.03±0.61**
t/Z				<i>t</i> = -20.790	<i>t</i> = 2.570	<i>Z</i> = -2.882
P				< 0.001	0.028	0.004
Pup	Control	6	3♂/3♀	2.41±0.35	3.79±0.26	3.40±0.28
	MMI	6	3♂/3♀	3.09±0.31**	3.19±0.21**	2.69±0.31**
t				-3.572	4.274	4.117
P				0.005	0.002	0.002

MMI: methimazole; Serum TSH: serum thyroid-stimulating hormone; Serum TT3: serum total triiodothyronine; Serum TT4: serum total thyroxine; Data are expressed as Mean ± SD. Student's *t*-test and Wilcoxon rank-sum test, *n*=6 per group, **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 vs. control. ♀:female; ♂: male.

2.3 子代鼠在发育期(P0~P21)血清及脑脊液中甲状腺激素水平的变化

酶联免疫吸附测定子代鼠在 P0、P2、P7、P14、P21 血清和脑脊液中 TSH、TT3、TT4、FT3 和 FT4。结果显示,甲减组子代鼠的血清中 TSH 水平从 P0 开始

到 P21 均明显高于对照组且 TT3 水平均明显低于对照组,但在 P0、P2 和 P7 子代鼠的血清中 FT3 水平经统计学分析无显著差异,在 P0 子代鼠血清中 FT4 水平无统计学意义;而与对照组相比,子代鼠的脑脊液中 FT4 水平在发育期(P0~P21)均明显降低(表4)。

表4 子代鼠在发育期(P0~P21)血清及脑脊液中的TSH、TT3、TT4、FT3、FT4水平及变化趋势
Table 4 Levels and trends of TSH, TT3, TT4, FT3, and FT4 in serum and cerebrospinal fluid of offspring rats during the developmental period (P0-P21)

Groups	<i>n</i>	Sex	Age	Serum TSH /(μ U/mL)	Serum TT3 /(ng/dL)	Serum TT4 /(ng/mL)	Serum FT3 /(pg/dL)	Serum FT4 /(ng/mL)	CSF FT4 /(pg/mL)
Control	6	3♂3♀	P0	2.41±0.35	3.79±0.26	3.40±0.28	10.84±1.57	0.52±0.033	33.94±2.04
MMI	6	3♂3♀	P0	3.09±0.31**	3.20±0.21**	2.69±0.31**	9.47±1.27	0.48±0.054	30.03±2.48*
<i>t</i>				-3.572	4.274	4.117	1.662	1.804	2.979
<i>P</i>				0.005	0.002	0.002	0.128	0.101	0.014
Control	6	3♂3♀	P2	2.19±0.16	12.08±1.13	11.08±1.24	15.22±0.96	0.83±0.095	40.43±2.30
MMI	6	3♂3♀	P2	2.69±0.26**	9.41±1.31**	8.45±1.37**	13.94±1.49	0.66±0.11*	35.90±3.10*
<i>t</i>				-3.952	3.787	3.477	1.762	2.848	2.876
<i>P</i>				0.003	0.004	0.006	0.109	0.017	0.017
Control	6	3♂3♀	P7	1.71±0.14	42.99±5.62	35.15±2.69	34.63±1.94	1.27±0.11	85.24±5.39
MMI	6	3♂3♀	P7	2.11±0.19**	31.93±4.82**	29.92±3.52*	31.92±3.56	1.11±0.13*	72.63±7.33**
<i>t</i>				-4.037	3.656	2.891	1.639	2.313	3.398
<i>P</i>				0.002	0.004	0.016	0.132	0.043	0.007
Control	6	3♂3♀	P14	1.46±0.16	76.06±5.50	54.92±7.12	155.18±12.24	2.60±0.29	170.11±9.34
MMI	6	3♂3♀	P14	1.74±0.20*	65.04±7.09*	44.98±5.70*	135.26±13.68*	1.99±0.33**	134.65± 15.20***
<i>t</i>				-2.730	3.007	2.669	2.658	3.382	4.867
<i>P</i>				0.021	0.013	0.024	0.024	0.007	<0.001
Control	12	6♂6♀	P21	1.06±0.082	82.87±6.49	59.69±9.07	271.35±16.22	2.65±0.25	184.25±10.11
MMI	12	6♂6♀	P21	0.50±0.12***	76.06±5.13**	49.96±7.82*	257.11±14.08*	2.35±0.19**	142.75± 12.39***
<i>t</i>				13.244	2.853	2.816	2.297	3.381	8.988
<i>P</i>				<0.001	0.009	0.010	0.031	0.003	<0.001

MMI: methimazole; Serum TSH: serum thyroid stimulating hormone; Serum TT3: serum total triiodothyronine; Serum TT4: serum total thyroxine; Serum FT3: serum free triiodothyronine; Serum FT4: serum free thyroxine; CSF FT4: cerebrospinal fluid free thyroxine; Data are expressed as Mean \pm SD. Student's *t*-test, *n*=6 per group for P0-P14, *n*=12 per group for P21, **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 vs. control. ♀:female; ♂:male.

2.4 子代鼠在发育期(P2~P21)的行为学表现

超声发声试验结果显示,甲减组子代鼠从P2开始,USV的数量(次)显著低于对照组(P2:甲减组450±35.36 vs. 对照组502±27.71, *P*<0.05; P7:甲减组429.5±43.90 vs. 对照组594.33±62.72, *P*<0.001; P14:甲减组334.5±24.22 vs. 对照组389.83±31.75, *P*<0.01), USV持续时间(s)较对照组明显减少(P2:甲减组124.88±9.76 vs. 对照组143.17±13.74, *P*<0.05; P7:甲减组109.56±20.17 vs. 对照组205.77±26.40, *P*<0.001; P14:甲减组56.75±10.98 vs. 对照组113.31±12.73, *P*<0.001), USV的发声特征

或与焦虑样行为增强相关,行为学实验结果提示子代存在明显焦虑样行为(图1A-F)。

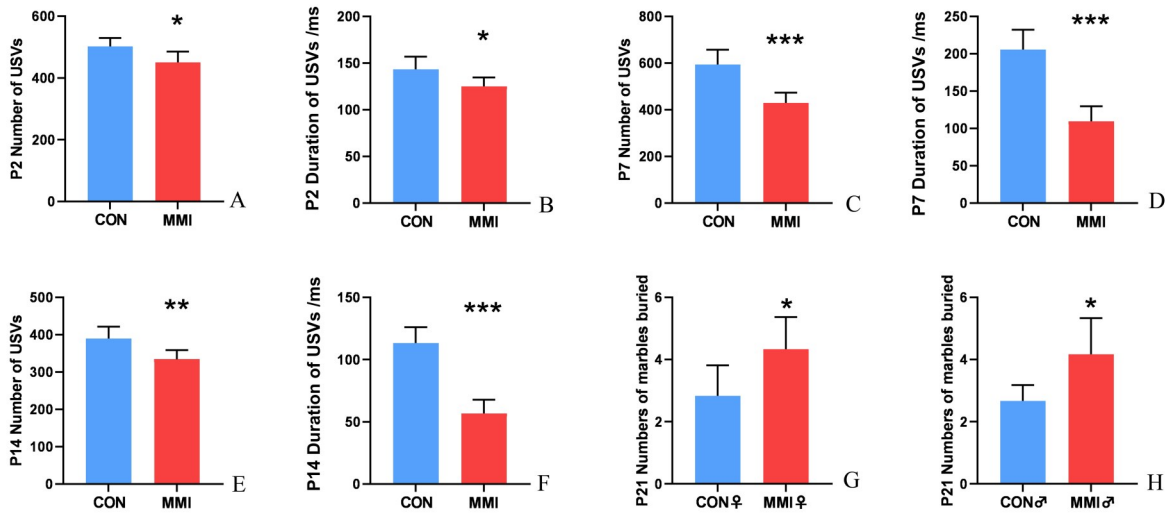
大理石埋藏试验结果表明, P21甲减组子代鼠的大理石埋藏数量(颗)显著高于对照组,且雌雄个体表现一致(雌性:甲减组4.33±1.03, 对照组2.83±0.98; 雄性:甲减组4.17±1.17, 对照组2.67±0.52; *P*均<0.05)。该结果提示,母体甲减状态可显著增加子代鼠的重复刻板行为,且此效应在雌雄子代中无明显性别差异(图1G-H)。

P21子代鼠已完成断奶,神经系统和运动能力显著发育,在此阶段开展TCT可观察到明显的社交

偏好行为。结果表明,与对照组相比,甲减组子代鼠嗅探陌生鼠1和陌生鼠2的时间(s)均显著减少,且雌雄个体表现趋势一致(陌生鼠1:雌性甲减组 100.14 ± 7.51 vs. 对照组 249.75 ± 15.72 ,雄性甲减组 100.01 ± 12.33 vs. 对照组 251.10 ± 18.45 ;陌生鼠2:雌性甲减组 102.12 ± 10.18 vs. 对照组 196.55 ± 18.63 ,雄性甲减组 98.78 ± 13.41 vs. 对照组 204.85 ± 22.15 ; P 均 <0.001)。这表明P21甲减组子代鼠可能出现社交行为异常,提示其社交认知或社交动机受损,且该异常在雌雄子代中无显著性别差异(图2)。

旷场试验的统计分析表明,在中央区域停留时

间(s)方面,雌性子代中,甲减组显著短于对照组(甲减组: 36.23 ± 3.53 ,对照组: 40.51 ± 1.90 ; $P<0.05$);雄性子代中,两组差异趋势与雌性一致(甲减组: 38 ± 4.31 ,对照组: 43.20 ± 2.99 ; $P<0.05$)。在中央区域进入次数(次)方面,雌性子代中,甲减组显著少于对照组(甲减组: 17 ± 2.19 ,对照组: 20.16 ± 1.94 ; $P<0.05$);雄性子代中,甲减组同样显著少于对照组(甲减组: 17.67 ± 1.75 ,对照组: 21.67 ± 2.16 ; $P<0.01$)。上述结果提示甲减可显著加剧小鼠焦虑样行为,且该影响无明显性别差异(图3)。



Ultrasonic emission testing and marble burial testing results. A-F: USV indicators of offspring rats in control and MMI groups. A/B: USVs number ($t=2.836, P=0.018$) and duration ($t=2.658, P=0.024$) at P2; C/D: USV number ($t=5.274, P<0.001$) and duration ($t=7.093, P<0.001$) at P7; E/F: USV number ($t=3.394, P=0.007$) and duration ($t=8.242, P<0.001$) at P14. G-H: Marble burial number of offspring rats at P21; G ($t=-2.577, P=0.028$); H ($t=-2.875, P=0.017$), $n=6$ per group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs. control.

图1 发育期(P2~P21)子代鼠在超声发声试验和大理石埋藏试验中的行为学表现

Fig. 1 Behavioral performance of offspring rats during the developmental period (P2-P21) in the ultrasonic vocalization test and marble burial test

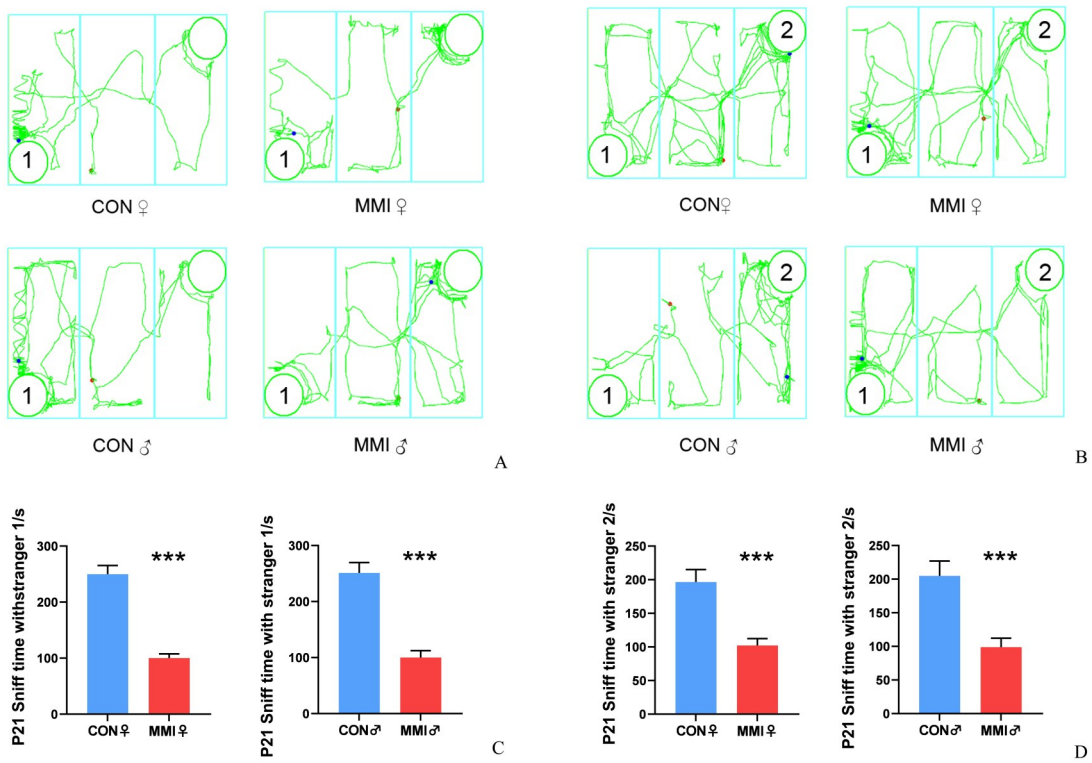
2.5 子代鼠在发育期(P7、P14、P21)脑脊液中FT4水平与行为学表现呈现正相关

进一步相关性分析结果显示(图4),在P7及P14阶段,甲减组子代鼠脑脊液中FT4水平与USVs数量均呈显著正相关(P7: $r=0.883, P<0.05$; P14: $r=0.902, P<0.05$),提示早期中枢神经系统内具有生物活性的FT4水平,可能直接影响子代鼠的发声交流能力。

至P21阶段,甲减组子代鼠脑脊液中FT4水平与三箱社交试验中嗅探陌生鼠2的时间仍呈现显

著正相关($r=0.814, P<0.01$),表明中枢FT4水平持续参与子代鼠社交行为的调控,其水平不足可能是导致社交认知或社交动机受损的重要因素。

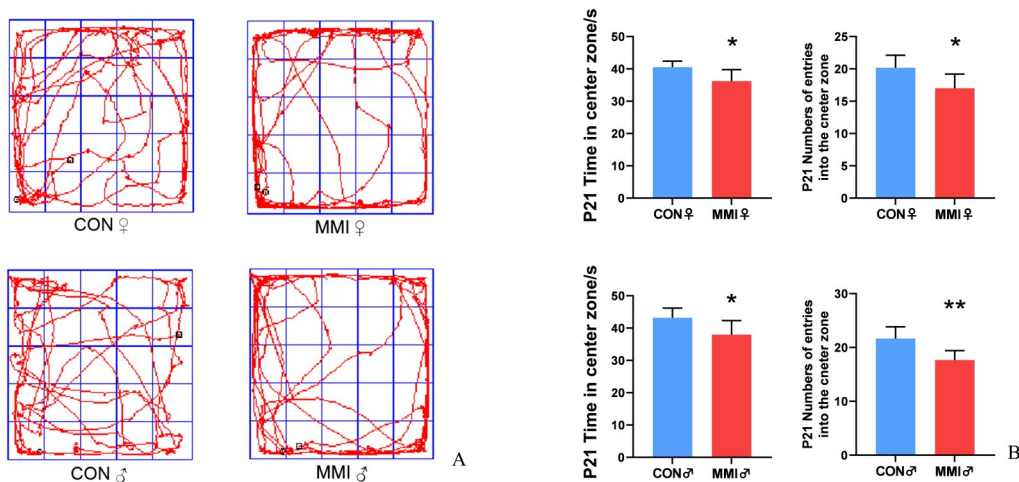
值得注意的是,在P7、P14及P21这三个关键发育阶段,甲减组子代鼠血清中甲状腺功能核心指标(TSH、TT3、TT4、FT3和FT4)同行为学表现均无显著相关性(均 $P>0.05$)。这一结果提示中枢神经系统局部的甲状腺激素水平(以脑脊液FT4为代表),而非外周循环中的激素水平,更能反映其对脑功能及相关行为表型的调控作用。



Three box social test trajectory diagram and statistical analysis results. A: Trajectory diagrams of the "Stranger 1 vs. Empty Cage" test (left chamber of the three-chamber setup = Stranger 1 chamber, right chamber = empty cage, both marked with green circular zones). B: Trajectory diagrams of the "Stranger 1 vs. Stranger 2" test (left chamber of the three-chamber setup = Stranger 1 chamber, right chamber = Stranger 2 chamber, both marked with green circular zones). C-D: Statistical analysis of female and male offspring rats sniffing stranger 1 and 2. $n=6$ per group. *** $P<0.001$ vs. control. ♀: female; ♂: male.

图2 P21子代鼠在三箱社交试验中的行为学表现

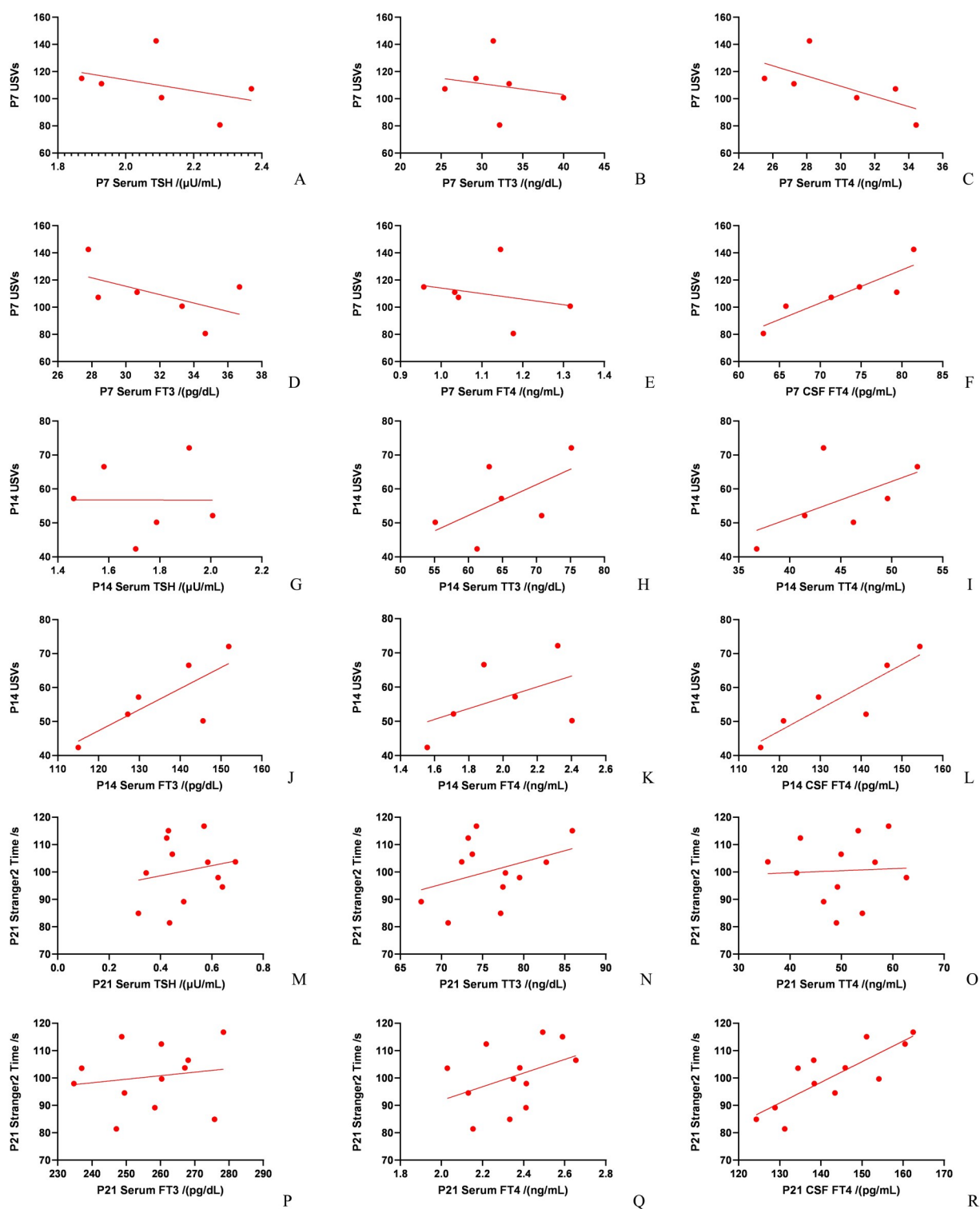
Fig. 2 Behavioral performance of P21 offspring rats in the three-box social interaction test



Open-Field test trajectory diagram and statistical analysis results. A: Shows that the movement trajectories of P21 offspring rats in the control and MMI groups within 5 minutes (overhead view of the open field). Red continuous lines represent mouse movement paths, with line density indicating dwell frequency (higher density signifies longer dwell time in that area). B: Statistical analysis of the duration of stay and number of entries into the central area of the open field for female and male P21 offspring rats. $n=6$ per group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. control. ♀: female; ♂: male.

图3 P21子代鼠在旷场试验中的行为学表现

Fig. 3 Behavioral performance of P21 offspring rats in the open field test



Pearson correlation analysis results. A-E: Shows that serum thyroid hormone levels were not significantly correlated with P7 USVs, $n=6$. F: Shows that there is a significant positive correlation between CSF FT4 levels and P7 USVs. ($r=0.883, P=0.0198$), $n=6$. G-K: Shows that there is no significant correlation between serum thyroid hormone levels and P14 USVs, $n=6$. L: Shows that there is a significant positive correlation between CSF FT4 levels and P14 USVs. ($r=0.902, P=0.0139$), $n=6$. M-Q: Shows that there is no significant correlation between serum thyroid hormone levels and P21 sniffing stranger2 time, $n=12$. R: Shows that there is no significant correlation between CSF FT4 levels and P21 sniffing stranger2 time. ($r=0.814, P=0.0013$), $n=12$.

图4 甲减组子代鼠在发育期(P7、P14、P21)血清和脑脊液甲状腺激素水平与行为学表现之间的相关性
Fig. 4 Correlation between serum and cerebrospinal fluid thyroid hormone levels and behavioral performance in offspring of hypothyroidism group rats during the developmental period (P7, P14, P21)

3 讨论

本研究的结果显示子代鼠脑脊液中FT4水平与自闭样行为指标呈现显著正相关,而血清中的甲状腺激素水平与自闭样行为指标不具有显著的相关性,提示脑脊液中FT4水平在预测子代自闭样行为的发生中具有潜在的临床应用价值。

鉴于甲状腺激素在机体发育过程中发挥着广泛而关键的作用,本研究所选用的动物模型表现出自闭、焦虑、抑郁等多种与神经心理疾病相关的异常行为,这些行为学异常已通过其他使用相同动物模型的研究报告得到了充分证实^[25-26]。本研究聚焦于与ASD相关的核心行为表型(如社交互动缺陷、重复刻板行为及焦虑样行为等)^[27]。研究结果表明,发现这些行为表型均存在显著的损害,与该领域研究报道相一致。此外,本研究还关注了孕期甲减诱导的子代鼠在发育期(P0~P21)ASD样行为表现,进一步揭示了模型鼠子代的脑脊液中FT4水平与ASD样行为的相关性。

在神经元发育和功能方面,甲状腺激素的不足可能通过基因表达调控、神经递质调节、神经元形态与突触可塑性等导致上述行为学异常。研究表明,甲状腺激素可以调节细胞的生成、存活、分化、迁移、生长与收缩^[28]。动物模型显示,母体甲减会导致后代reelin表达下降及凋亡增加,而reelin异常与ASD相关,提示T4缺乏可能干扰神经元迁移和突触形成^[29]。此外,孕期甲减母体的后代关键大脑区域内的神经元数量大幅减少,这表明存在潜在的神经退行性变或发育障碍^[30]。T4异常可影响多巴胺、5-羟色胺、谷氨酸等神经递质系统。甲减患者5-羟色胺水平降低,与焦虑症状相关;多巴胺能神经元功能受T4水平影响,其异常可能导致社交障碍^[31]。同时FT4水平的下降可能会影响神经可塑性过程,从而损害神经和功能恢复^[32]。

在胶质细胞的发育和功能方面,甲状腺激素能够调控星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞等不同亚型神经胶质细胞的分化与成熟进程:如研究报道甲状腺激素一方面通过TR介导的转录作用调控少突胶质细胞分化及髓磷脂合成^[12];另一方面,除活性形式T3外,T4对星形胶质细胞的作用也得到验证,这一发现提示甲状腺激素或可通过非基因组途径影响星形胶质细胞的功能^[33]。以上机制

都可能参与孕期甲状腺激素不足导致后代发生神经发育障碍的过程。

血清中的甲状腺激素水平受到全身多个器官代谢的综合影响,反映了全身甲状腺激素的整体代谢状态^[34]。相比之下,脑脊液中的甲状腺激素水平主要受脑组织代谢的影响,较少受到脑外代谢的干扰^[35],因此可以更直接地反映脑组织的甲状腺激素代谢情况。这可能是导致血清中的甲状腺激素水平与自闭样行为指标不具有显著相关性的原因。脑内神经元的发育与功能不仅依赖循环FT4,更依赖脑脊液FT4经星形胶质细胞II型脱碘酶(D2)转化为活性T3的“局部代谢池”^[36]。脑脊液FT4水平直接决定脑内T3生成效率,进而调控神经元突触形成(如PSD95表达)、轴突延伸等关键过程;而血清FT4无法反映脑内脱碘酶介导的局部激素转化效率,难以与神经元主导的行为表型建立直接关联^[37]。血脑屏障的选择性转运是核心差异环节:血清FT4需通过血脑屏障特异性转运蛋白(如MCT8、OATP1C1)才能进入中枢脑脊液,这一过程具有严格的组织特异性和功能调控性^[38]。例如,MCT8突变患者常表现为血清甲状腺激素水平正常,但因转运障碍导致脑脊液FT4不足,进而引发神经发育异常,印证了血脑屏障可造成“外周—中枢FT4解离”。在讨论部分我们也有提及血清FT4仅反映全身循环状态,而脑脊液FT4才是脑内可利用激素的直接体现,故与中枢调控的行为表型更直接相关。

在对ASD进行行为学检测时,我们发现在行为学检测的关键窗口期(P2~P21)内,性别差异并不显著。这一结果与相关文献的报告一致^[9,39]。本研究主要关注P21前的早期行为,而青春期后性激素的激增,则可能重塑神经环路,从而导致雌雄个体的ASD样行为出现分化。已有研究显示,雄性大鼠在青春期后社交缺陷会进一步加剧,而雌性可能因雌激素的保护作用表现出症状缓解,这提示需延长观察周期以排除性别差异的时间依赖性^[40]。综上所述,本研究中孕期甲减诱导的Wistar子代鼠ASD样行为未表现出明显性别差异,可能反映了早期神经发育阶段甲状腺激素调控的核心通路在雌雄个体中的共性。

本研究结果为理解ASD的早期病理机制提供了新视角,并提示脑脊液中的FT4有望成为评估子代ASD风险的潜在早期生物标志物。然而,本研究采用动物模型的核心意义在于,通过可控实验排除

临床混杂因素(如遗传异质性),直接验证“甲状腺激素异常→脑发育关键环节受损→社交/焦虑行为异常”的因果链条。尽管涉及婴儿阶段脑脊液检测的临床研究需要复杂且严格伦理学审批,开展相应的临床研究可能存在一定的困难,但这一方向仍值得尝试。

同时,我们在此提出2种替代性转化研究方案:①由于自闭症通常在6岁左右确诊,如果能够 在3~5岁期间通过检测脑脊液中的FT4来进行预测,那么这将具有显著的临床应用价值。这一替代

方案可避开婴儿和新生儿阶段,从而使得开展临床研究所需的伦理学审批相对容易;②因为脑脊液颈内静脉回流,基于本研究结果,我们计划进一步开展评估检测颈内静脉血液中的游离甲状腺素(FT4)对模型动物自闭症样表现预测价值的研究。如取得预期结果,有望通过颈内静脉检测来建立自闭症的临床转化方法。此外,基于本研究的发现,未来也拟进一步探索FT4对核心脑区(如内侧前额叶皮质等)发育与自闭核心行为(如社交障碍等)表型发生、发展的潜在影响及机制。

参考文献

- [1] Lord C, Elsabbagh M, Baird G, et al. Autism spectrum disorder[J]. *Lancet*, 2018, 392(10146): 508–520.
- [2] Wilson HA, Creighton C, Scharfman H, et al. Endocrine insights into the pathophysiology of autism spectrum disorder [J]. *Neuroscientist*, 2021, 27(6): 650–667.
- [3] Jiang CC, Lin LS, Long S, et al. Signalling pathways in autism spectrum disorder: mechanisms and therapeutic implications [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 229.
- [4] Wang L, Wang B, Wu C, et al. Autism spectrum disorder: neurodevelopmental risk factors, biological mechanism, and precision therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3):1819.
- [5] 陈光华,陶冠澎,翟璐煜,等.自闭症谱系障碍的早期筛查工具[J]. *心理科学进展*, 2022, 30(4): 738–763.
Chen GH, Tao GP, Zhai LY, et al. Early screening tools for autism spectrum disorder[J]. *Adv Psychol Sci*, 2022, 30(4): 738–763.
- [6] Maksimovic S, Marisavljevic M, Stanojevic N, et al. Importance of early intervention in reducing autistic symptoms and speech–language deficits in children with autism spectrum disorder[J]. *Children (Basel)*, 2023, 10(1):122.
- [7] 赵文璐,李晶.孤独症早期鉴别:从细胞通路到脑神经标记物[J]. *中国科学:生命科学*, 2025, 55(1): 98–112.
Zhao WL, Li J. Early identification of autism: from cellular pathways to brain neural markers [J]. *Sci China Life Sci*, 2025, 55(1): 98–112.
- [8] 刘锦明,陈庆欣,陈琪,等.孤独症儿童日常执行功能与其核心症状及注意缺陷多动症状的关联[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2023, 44(5): 776–783.
Liu JM, Chen QX, Chen Q, et al. Association between daily executive function and core symptoms, attention deficit–hyperactivity symptoms in children with autism spectrum disorder[J]. *J Sun Yat–Sen Univ (Med Sci)*, 2023, 44(5): 776–783.
- [9] Horwitz E, Vos M, De Bildt A, et al. Sex differences in the course of autistic and co-occurring psychopathological symptoms in adolescents with and without autism spectrum disorder[J]. *Autism*, 2023, 27(6): 1716–1729.
- [10] De Souza JS. Thyroid hormone biosynthesis and its role in brain development and maintenance [J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2024, 142: 329–365.
- [11] Brent GA. A historical reflection on scientific advances in understanding thyroid hormone action [J]. *Thyroid*, 2023, 33(10): 1140–1149.
- [12] Mohacsik P, Zeold A, Bianco AC, et al. Thyroid hormone and the neuroglia: both source and target [J]. *J Thyroid Res*, 2011, 2011: 215718.
- [13] Ge GM, Leung MTY, Man KKC, et al. Maternal thyroid dysfunction during pregnancy and the risk of adverse outcomes in the offspring: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2020, 105(12): dgaa555.
- [14] Esmaeli M. mechanisms involved in cerebrospinal fluid (CSF) drainage and interstitial fluid (ISF)/CSF exchange in the central nervous system (CNS) [J]. *Cell Tiss Biol*, 2025, 19: 83–101.
- [15] Rasmussen MK, Mestre H, Nedergaard M. Fluid transport in the brain [J]. *Physiol Rev*, 2022, 102(2): 1025–1151.
- [16] Saunders TS, Gadd DA, Spires–Jones TL, et al. Associations between cerebrospinal fluid markers and cognition in ageing and dementia: a systematic review [J]. *Eur J Neurosci*, 2022, 56(9): 5650–5713.
- [17] Johansson P, Almqvist EG, Johansson JO, et al. Reduced cerebrospinal fluid level of thyroxine in patients with Alzheimer’s disease [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2013, 38(7): 1058–1066.
- [18] Quinlan P, Horvath A, Eckerstrom C, et al. Altered thyroid hormone profile in patients with Alzheimer’s disease [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2020, 121: 104844.

- [19] 毕书荣, 田玉玲, 陈香莲, 等. 帕金森病患者甲状腺激素水平与认知功能的相关性研究[J]. 神经损伤与功能重建, 2024, 19(5): 272-275; +295.
- Bi SR, Tian YL, Chen XL, et al. Correlation between thyroid hormone levels and cognitive function in patients with Parkinson's disease [J]. *Neural Injury Repair Funct Reconstr*, 2024, 19(5): 272-275; +295.
- [20] Long Y, Zhao Z, Xie W, et al. Kallistatin leads to cognition impairment via downregulating glutamine synthetase [J]. *Pharmacol Res*, 2024, 202: 107145.
- [21] Menezes EC, Santos PR, Goes TC, et al. Effects of a rat model of gestational hypothyroidism on forebrain dopaminergic, GABAergic, and serotonergic systems and related behaviors[J]. *Behav Brain Res*, 2019, 366: 77-87.
- [22] Tegler L, Lindstrom B. Antithyroid drugs in milk[J]. *Lancet*, 1980, 2(8194): 591.
- [23] Azizi F, Hedayati M. Thyroid function in breast-fed infants whose mothers take high doses of methimazole [J]. *J Endocrinol Invest*, 2002, 25(6): 493-496.
- [24] Azizi F. Thyroid function in breast-fed infants is not affected by methimazole-induced maternal hypothyroidism: results of a retrospective study[J]. *J Endocrinol Invest*, 2003, 26(4): 301-304.
- [25] Gonzalez-Madrid E, Rangel-Ramirez MA, Opazo MC, et al. Gestational hypothyroxinemia induces ASD-like phenotypes in behavior, proinflammatory markers, and glutamatergic protein expression in mouse offspring of both sexes[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2024, 15: 1381180.
- [26] Gilbert ME, Hawks MG, Bell KS, et al. Iodine deficiency exacerbates thyroidal and neurological effects of developmental perchlorate exposure in the neonatal and adult rat[J]. *Toxics*, 2024, 12(12): 842.
- [27] Qin L, Wang H, Ning W, et al. New advances in the diagnosis and treatment of autism spectrum disorders[J]. *Eur J Med Res*, 2024, 29(1): 322.
- [28] Sinha RA, Singh BK, Yen PM. Direct effects of thyroid hormones on hepatic lipid metabolism [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14(5): 259-269.
- [29] Su Y, Yang X, Yang L, et al. Thyroid hormones regulate reelin expression in neuropsychiatric disorders [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2022, 100(11): 1033-1044.
- [30] Korevaar TI, Muetzel R, Medici M, et al. Association of maternal thyroid function during early pregnancy with offspring IQ and brain morphology in childhood: a population-based prospective cohort study [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2016, 4(1): 35-43.
- [31] Alcaide Martin A, Mayerl S. Local thyroid hormone action in brain development[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(15): 12352.
- [32] Mele C, Bagnato S, De Tanti A, et al. Free thyroxine (fT4) as a potential biomarker of neurological and functional outcome in acquired brain injury: a prospective multicenter cohort study[J]. *J Clin Med*, 2023, 12(23): 7433.
- [33] Koibuchi N. The role of thyroid hormone on functional organization in the cerebellum [J]. *Cerebellum*, 2013, 12(3): 304-306.
- [34] Mullur R, Liu YY, Brent GA. Thyroid hormone regulation of metabolism[J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(2): 355-382.
- [35] Sawicka-Gutaj N, Zawalna N, Gut P, et al. Relationship between thyroid hormones and central nervous system metabolism in physiological and pathological conditions [J]. *Pharmacol Rep*, 2022, 74(5): 847-858.
- [36] Schroeder AC, Privalsky ML. Thyroid hormones, t3 and t4, in the brain[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014, 5: 40.
- [37] Guillen-Yunta M, Garcia-Aldea A, Valcarcel-Hernandez V, et al. Defective thyroid hormone transport to the brain leads to astroglial alterations[J]. *Neurobiol Dis*, 2024, 200: 106621.
- [38] Bernal J, Guadano-Ferraz A, Morte B. Thyroid hormone transporters--functions and clinical implications[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2015, 11(7): 406-417.
- [39] Tripathi MK, Ojha SK, Kartawy M, et al. Mutations associated with autism lead to similar synaptic and behavioral alterations in both sexes of male and female mouse brain [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 10.
- [40] Napolitano A, Schiavi S, La Rosa P, et al. Sex differences in autism spectrum disorder: diagnostic, neurobiological, and behavioral features[J]. *Front Psychiatry*, 2022, 13: 889636.

(编辑 黄子芸)